

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
3 janvier 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/00890 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C12N 15/55**, 15/29, 15/82, 9/16, A01H  
5/00, 5/10, A23K 1/165, A23L 1/105

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/02116

(22) Date de dépôt international : 2 juillet 2001 (02.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/08529 30 juin 2000 (30.06.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **BIO-  
GEMMA** [FR/FR]; 1, rue Edouard-Colonne, F-75001  
Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PEREZ,  
Pascual** [FR/FR]; 17, Chemin de la Pradelle, F-63450  
Chanonat (FR). **DI GIOIA, Tania** [FR/FR]; 101, rue  
Chateaubriand, F-63100 Clermont-Ferrand (FR).

(74) Mandataire : **JACOBSON, Claude**; Cabinet Lavoix, 2,  
place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien  
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen  
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,  
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.*



**WO 02/00890 A1**

(54) Title: NUCLEIC ACIDS CODING FOR A PLANT PHOSPHATASE OF THE MIPP TYPE WITH PHYTASE ACTIVITY  
AND USES

(54) Titre : ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR UNE PHOSPHATASE VEGETALE DE TYPE MIPP A ACTIVITE PHY-  
TASIQUE ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention concerns nucleic acid sequences coding for a MIPP type plant phosphatase with phytase activity, the  
isolated proteins encoded by said sequences, and their uses, in particular for improving food digestibility in animals.

(57) Abrégé : La présente invention concerne des séquences d'acides nucléiques codant pour une phosphatase végétale de type MIPP  
à activité phytasique, les protéines isolées codées par ces séquences, ainsi que leurs applications, notamment pour l'amélioration de  
la digestibilité des aliments pour animaux.

**Acides nucléiques codant pour une phosphatase végétale de type MIPP à activité phytasique et applications.**

La présente invention concerne des séquences d'acides nucléiques codant pour une phosphatase végétale de type MIPP à activité phytasique, les protéines isolées codées par ces séquences, ainsi que leurs applications.

Cette invention concerne plus précisément des séquences d'acides nucléiques de maïs, de riz et de blé codant pour une MIPP.

L'importance du rôle du phosphore dans la nutrition animale a été, depuis longtemps, reconnue. Le phosphore est essentiel à la croissance de l'animal ; 80% du phosphore est localisé dans le squelette. Le reste du phosphore est contenu dans les tissus mous où il intervient dans de nombreuses réactions biochimiques comme la synthèse des acides nucléiques, des phospholipides et de certaines vitamines B.

Le phosphore est fourni à l'animal par l'alimentation, principalement par les plantes. La plus grande partie du phosphate présent dans les plantes, notamment dans les semences, se trouve sous la forme de phytine, sel complexe de myo-inositol-acide hexakisphosphorique ou acide phytique. La phytine constitue donc une réserve de phosphore, de sucres, mais aussi de divers cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ).

La phytine, sel d'acide phytique complexé à divers cations, représente donc la forme majeure de stockage du phosphate dans les graines mais elle est également présente dans le pollen, les organes de stockage tels que les tubercules ou dans les racines. Sa distribution dans les graines varie d'une espèce à l'autre :

- chez les dicotylédones (soja, ricin), elle est présente majoritairement dans les cotylédons et l'albumen ;

- chez les céréales (blé, riz), elle est présente surtout dans l'aleurone alors qu'elle est absente dans l'albumen ;

- chez le maïs, la majorité de la phytine présente dans le grain est stockée dans l'embryon (O'Dell et al., 1972; Barba et al., 1997).

Dans les grains de maïs, le phosphore du phytate représente jusqu'à 88 % du phosphore total (O'Dell *et al.*, 1972). La dégradation de la phytine est assurée par des phosphatases spécifiques, dont les phytases, enzymes capables d'hydrolyser le phosphate à partir de l'acide phytique (Gibson et Ullah, 1990) en libérant du myo-inositol et du phosphate inorganique.

Toutefois les phosphatases de type phytase végétale sont produites en quantités insuffisantes dans les parties des plantes utilisées pour l'alimentation de certains animaux.

En particulier, la phytine et l'acide phytique provenant de farines de semences sèches, ne sont pas digérés par les animaux monogastriques (comme le porc et le poulet) en l'absence de phosphatase exogène, et sont donc excrétés tels quels. Ils contribuent ainsi à la pollution des sols et des eaux, par le phosphate, dans les zones d'élevages intensifs. De plus, l'acide phytique est considéré comme un facteur anti-nutritionnel car il chélate les éléments minéraux et provoque l'agrégation des protéines. Par conséquent, ces minéraux et protéines ne seront pas correctement assimilés lors du transit intestinal, par les animaux monogastriques (Graf, 1986).

Des recherches ont été entreprises afin de permettre une meilleure digestibilité de la phytine et de l'acide phytique chez les animaux monogastriques. De nombreux travaux se sont portés principalement sur les phosphatases ou d'autres types d'enzymes intervenant dans la mobilisation de la phytine. Par exemple, des gènes codant pour des phytases de céréales ont été isolés. L'identification des gènes Phyt I et Phyt II, provenant du maïs a ainsi permis d'obtenir des plantes de maïs présentant une teneur accrue en phytase (WO 98/05785).

Les auteurs de la présente invention, quant à eux, se sont intéressés à une autre famille d'enzymes, qui ne présentent pas d'homologie significative avec Phyt I ou Phyt II : les MIPP - Multiple Inositol Polyphosphate Phosphatases, apparentées aux histidine phosphatases répertoriées uniquement dans le règne animal. Elles jouent un rôle important dans les processus d'ossification, notamment dans le développement et la différenciation des chondrocytes (Romano *et al.*, 1998). Ces phosphatases sont également connues comme étant les seules enzymes animales qui hydrolysent les molécules d'inositol-tétra-, -penta- et -hexaphosphate (Chi *et al.*, 1999).

Alors que ces enzymes étaient jusqu'alors reconnues comme spécifiques de l'espèce animale, les auteurs de la présente invention sont parvenus à caractériser des séquences d'acides nucléiques de plantes présentant une homologie significative avec les gènes codant pour les MIPP animales. Aussi les enzymes codés par ces acides nucléiques de plantes seront par la suite appelées MIPP végétales.

La phytine, un substrat privilégié pour les MIPP, libère ainsi du phosphate inorganique ainsi que les cations chélatés. Le phosphate inorganique et les différents cations libérés sont alors disponibles pour les voies métaboliques qui les requièrent.

La présente invention a donc pour objet un acide nucléique isolé codant pour une enzyme MIPP végétale à activité phytasique. Les enzymes MIPP des céréales sont particulièrement visées, en particulier celles du maïs, du riz et du blé. L'invention a plus particulièrement pour objet un acide nucléique isolé comprenant une séquence choisie parmi  
5 SEQ ID n°1 (ADNc de maïs), SEQ ID n°3 (ADNc de riz) ou SEQ ID n° 17 (ADNc de maïs).

De manière préférentielle, l'invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence SEQ ID n° 17 ou une séquence homologue à la séquence SEQ ID n° 17.

Les séquences complémentaires de ces séquences d'acides nucléiques font également partie de la présente invention.  
10

L'invention a également pour objet, des fragments des séquences ci-dessus codant pour des peptides conservant l'activité mentionnée, ou les séquences complémentaires de ces fragments.

L'invention concerne aussi les séquences homologues des séquences mentionnées plus haut.  
15

Le terme "homologue" fait référence à tout acide nucléique présentant une ou plusieurs modification(s) de séquence par rapport à tout ou partie d'une séquence donnée.

Ces séquences homologues sont, de manière préférentielle, définies comme:

i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou  
20 n° 17, de préférence au moins 80%, de préférence encore au moins 90%; ou

ii) des séquences hybridant avec la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n°17, ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation, ou

iii) des séquences codant pour une enzyme MIPP végétale comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n°2, n°4 ou n° 18, ou une séquence d'acides aminés homologue.  
25

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T<sub>m</sub>).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T<sub>m</sub> est définie par la relation :  
30  $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\% \text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$  (Sambrook et al., 1989).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T<sub>m</sub> est définie par la relation :  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ .

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence de 5 à 10°C en dessous de T<sub>m</sub>, et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue à l'ORF représentée à la SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 par mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code pour un polypeptide présentant l'activité phytasique de la MIPP végétale.

Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de céréales autres que le maïs ou le riz, ainsi que les variants alléliques.

La présente invention a également pour objet un polypeptide isolé, dénommé MIPP végétale, comprenant de préférence la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2, n° 4 ou n° 18. Plus particulièrement, le polypeptide comprend la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 18. Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies de manière avantageuse comme

i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID n° 2, n° 4 ou n° 18, de préférence au moins 80%, de préférence encore au moins 90%; ou

ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie précédemment c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique hybridant avec la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux

chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par « séquence d'acides aminés homologue », on entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID n° 2, n° 4 ou n° 18 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudoacides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique de la MIPP végétale.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

"L'activité biologique de la MIPP végétale" se réfère notamment à son activité phytasique, qui peut être déterminée par le dosage du phosphate libéré par l'enzyme à partir de phytate de sodium.

Le polypeptide de la présente invention peut être synthétisé par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Le polypeptide de l'invention peut par exemple être synthétisé par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

Une protéine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique selon l'invention, tel qu'un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 ou une séquence homologue est transféré dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du

surageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, etc.

La présente invention a donc également pour objet une méthode de production de protéine MIPP végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :

5 a) transformation d'une cellule, en particulier d'un végétal ou d'un microorganisme, avec une cassette d'expression comportant des séquences régulatrices capables de commander l'expression d'une quantité accrue de MIPP dans ladite cellule hôte ;

b) éventuellement culture de ladite cellule hôte ou, dans le cas où cette cellule hôte est une cellule végétale, croissance de la plante transformée ;

10 c) extraction de la protéine MIPP de la culture cellulaire ou de la plante transformée.

La présente invention a donc aussi pour objet une cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte au moins une des séquences ou fragments d'acide  
15 nucléique tels que définis précédemment, placé sous le contrôle d'au moins une séquence régulatrice capable de commander l'expression de la protéine MIPP végétale.

Parmi ces séquences régulatrices, on peut citer les promoteurs, les activateurs et les introns et les terminateurs de transcription.

Un grand nombre de promoteurs sont utilisables pour la transformation des  
20 plantes selon la présente invention. A titre d'exemple on peut citer :

- des promoteurs permettant une expression constitutive :

- promoteur p35S (Kay et al., 1987)
- promoteur pUbi1 du gène codant pour l'ubiquitine 1 de maïs (Christensen *et al.*, 1992)
- 25 - promoteur pAct1 du gène codant l'actine 1 de riz (Mc Elroy *et al.*, 1991)
- promoteurs des histones (EP 0 507 698)
- promoteur CsVMV du virus de la mosaïque de la nervure du manioc (Verdaguer *et al.*, 1996, 1998)

- les promoteurs spécifiques d'un organe ou d'un tissu de la plante, et plus particulièrement  
30 les promoteurs spécifiques des grains (Datla *et al.*, 1997), comme les promoteurs de gènes codant pour des protéines de réserve telles que : une gluténine de masse moléculaire élevée HMWG (High Molecular Weight Glutenin) de blé ou d'orge spécifique de l'albumen (Roberts *et al.*, 1989 ; Anderson O.D. *et al.*, 1989), la napine, la phaséoline, l'hélianthinine, l'albumine, l'oléosine, GEA1 et GEA6 d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier *et al.*, 1993), la  $\gamma$ -zéine de maïs,

le promoteur du gène pHyPRP codant pour une protéine hybride riche en proline de maïs (HyPRP : Hybrid Proline Rich Protein) qui est spécifique de l'embryon et plus particulièrement du scutellum (Josè-Estanyol et al, 1992), le promoteur Vp1 du gène Viviparous1 (activateur de transcription - Mc Carty D.R et al (1989)) combiné au premier intron Sh du gène Shrunk (Maas et al (1991)), qui est spécifique de l'aleurone.

- des promoteurs inductibles :

- lors d'un stress hydrique (Kasuga *et al.*, 1999)
- par la lumière : promoteur du gène codant pour la petite sous unité de la RUBISCO, Ribulose 1,5 BISphosphate Carboxylase Oxygénase, promoteur du gène codant pour la chlorophylle a/b,

- des promoteurs des gènes codant la mannopine synthase, la nopaline synthase, l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*,
- des promoteurs de gènes codant pour des enzymes choisis de préférence parmi ceux-ci : l'alcool déshydrogénase 1 (Adh1) de maïs, la phénylalanine ammonia lyase (PAL), la HMG-CoA reductase (HMG), la chitinase, la glucanase, les inhibiteurs de protéases, les gènes de la famille PR1, le gène vspB (US 5,670,349), HMG2 (US 5,670,349), la bêta-galactosidase (Abg1) de pomme, ou l'amino-cyclopropane carboxylate synthase (WO 98/45445).

Ainsi, l'expression ectopique tissu-spécifique ou organe-spécifique permet la production de graines riches en phosphate inorganique ou enrichies en protéine MIPP capables de dégrader la phytine tout en limitant les dommages physiologiques éventuels dus à une variation de la teneur en phytine.

De manière générale, on utilisera préférentiellement un promoteur constitutif tel que le promoteur pAct 1 du gène Act 1 de riz contenu dans le plasmide pAct1-F4 (Mc Elroy *et al.*, 1991) ou le promoteur p35S (Kay *et al.*, 1987), ou un promoteur tissu spécifique comme le promoteur HMWG de blé ou d'orge, ou encore le promoteur pCRU du gène de la cruciférine de radis, qui permettent tous trois une expression de la protéine d'intérêt dans les graines (Roberts *et al.*, 1989 ; Anderson O.D. *et al.*, 1989 ; Depigny-This *et al.*, 1992).

Conformément à l'invention, des éléments comme les activateurs et les introns peuvent également être insérés dans la cassette d'expression dans le but d'amplifier l'expression du gène d'intérêt.

Un exemple d'activateur est l'activateur de la traduction du virus TEV (Tobacco Etch Virus) décrit par Carrington et Freed (1990). Parmi les introns utilisables, le premier intron du gène Adh1S de maïs, qui peut être placé entre le promoteur et la séquence codante.



Cet intron lorsqu'il est inclu dans une construction génétique, augmente l'expression de la protéine désirée dans les cellules de maïs (Callis *et al.*, 1987). On peut aussi utiliser le premier intron du gène shrunken 1 de maïs (Maas *et al.*, 1991), le premier intron du gène de la catalase du pois, CAT-1 (Ohta *et al.*, 1990), le second intron du gène ST-LS1 de pomme de terre (Vancanneyt *et al.*, 1990), l'intron du gène TobYDV du virus 'yellow dwarf' (Morris *et al.*, 1992), l'intron du gène Act 1 codant l'actine 1 du riz (Mc Elroy *et al.*, 1990) ou encore l'intron 1 du gène codant pour la triosephosphate isomérase (Snowdon *et al.*, 1996).

De manière avantageuse, la cassette d'expression peut aussi contenir des séquences 5' non traduites dites 'leaders'. De telles séquences peuvent augmenter la traduction. Parmi celles connues de l'homme du métier, on peut citer :

- le leader EMCV (EncephaloMyoCarditis Virus 5' noncoding region) (Elroy-Stein *et al.*, 1989),
- le leader TEV (Tobacco Etch Virus) (Carrington and Freed, 1990),
- le leader du gène BiP codant pour la protéine de liaison à la chaîne lourde de l'immunoglobuline humaine (Macejack *et al.*, 1991),
- le leader AMV RNA 4 provenant de l'ARNm de la protéine du virus de la mosaïque de la luzerne (Jobling *et al.* 1987),
- le leader du virus de la mosaïque du tabac (Gallie *et al.*, 1989),

Parmi les terminateurs utilisables dans les constructions de l'invention, on peut citer notamment :

- le polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck *et al.* (1980),
- le terminateur nos correspondant à la région 3' non-codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1992),
- le terminateur du gène histone (EP 0 633 317),

Selon un mode de réalisation préférée, le terminateur de transcription est le terminateur nos du gène de la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Depicker *et al.*, 1992) ou alors la séquence polyA 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur (CaMV), décrit dans l'article de Franck *et al.* (1980).

Dans une variante de réalisation de l'invention, lesdites séquences régulatrices comprennent également des signaux d'adressage capables de diriger l'expression spécifiquement dans un type particulier de compartiment cellulaire, par exemple l'espace extracellulaire ou l'apoplasme.

Comme exemple de signaux d'adressage chloroplastiques, on peut citer la séquence codant pour le peptide transit du précurseur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-bis-phosphate carboxylase oxygénase de *Pisum sativum*. Comme signaux d'adressage mitochondrial, on peut citer la séquence codant pour le peptide transit du précurseur de la sous-unité  $\beta$  de l'ATP-ase F1 mitochondriale de *Nicotiana plumbaginifolia*.

Ces peptides transits, comprenant la méthionine N-terminale, sont normalement clivés dans les chloroplastes ou les mitochondries. L'expression des protéines dans ces organites a donc également la caractéristique de produire une molécule dépourvue de la méthionine N-terminale comme la molécule naturelle.

Selon une autre variante, les séquences d'adressage peuvent être des séquences codant pour un peptide signal N-terminal ("prépeptide"), éventuellement en association à un signal responsable de la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (signal du type KDEL ou KTEL), ou un signal d'adressage vacuolaire ou "propeptide". La présence du peptide signal N-terminal ou prépeptide permet l'introduction du néopolypeptide dans le réticulum endoplasmique où ont lieu un certain nombre de modifications post-traductionnelles, notamment le clivage du peptide signal, les N-glycosylations, si la protéine en question présente des sites de N-glycosylation, et la formation des ponts disulfures. Parmi ces différents signaux, le prépeptide, responsable de l'adressage de la protéine dans le réticulum endoplasmique, est très utile. Il s'agit normalement d'un peptide signal N-terminal hydrophobe ayant entre 10 et 40 acides aminés et étant d'origine animale ou végétale. De préférence, il s'agit d'un prépeptide d'origine végétale, par exemple celui de la sporamine, de la lectine d'orge, de l'extensine végétale, de la protéine PR1 ou PR2.

Normalement, le peptide signal est clivé par une signal-peptidase dès l'introduction co-traductionnelle du néopolypeptide dans la lumière du RER (Reticulum Endoplasmique Rugueux). La protéine mature ne comporte plus cette extension N-terminale.

Pour obtenir la sécrétion, selon un mode de réalisation de l'invention, on peut par exemple utiliser le peptide signal de la sporamine A des racines tubérisées de la patate douce.

Les séquences d'adressage peuvent, outre le prépeptide, comporter aussi un signal de rétention endoplasmique, consistant en les peptides KDEL, KTEL, SEKDEL ou HEKDEL. Ces signaux se trouvent normalement à l'extrémité C-terminale de la protéine et peuvent subsister sur la protéine mature. La présence de ce signal a tendance à augmenter les rendements en protéines recombinantes.

La présence de séquences de type KDEL ou KTEL à l'extrémité C-terminale des protéines conduit à la rétention de celles-ci dans le réticulum endoplasmique et donc à une

compartimentalisation cellulaire de ces protéines. Cette compartimentalisation peut dans certains cas bloquer l'accessibilité de l'enzyme à son substrat présent dans un compartiment cellulaire différent, conduisant à une inactivité de la protéine. Ainsi, selon une variante, il est possible d'envisager l'élimination de ce type de séquences d'adressage sans perdre l'activité enzymatique de la protéine. L'élimination de ces séquences peut conduire à une expression apoplastique de la protéine pouvant permettre une meilleure accessibilité de la protéine à son substrat. L'élimination peut conduire aussi à une expression de la protéine dans un autre compartiment que celui où s'exprime son substrat, évitant ainsi une dégradation rapide de l'acide phytique susceptible d'altérer le développement de la graine.

L'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat peut donc être contrôlée dans l'espace et dans le temps. Eventuellement, une étape ultérieure de broyage de la graine peut être mise en œuvre pour permettre à l'enzyme d'accéder à son substrat.

L'élimination de la séquence KTEL ou KDEL peut être réalisée notamment par la technique d'amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques de la partie C-terminale de la protéine juste en amont de la séquence KTEL ou KDEL et en ajoutant sur l'amorce un codon stop.

Les signaux d'adressage peuvent, outre le prépeptide, comporter aussi un signal d'adressage vacuolaire ou "propeptide". En présence d'un tel signal, après passage dans le RER, la protéine est adressée aux vacuoles des tissus aqueux, par exemple les feuilles, ainsi qu'aux corps protéiques des tissus de réserve, par exemple les graines, tubercules et racines. L'adressage de la protéine vers les corps protéiques de la graine est particulièrement intéressant en raison de la capacité de la graine à accumuler des protéines, jusqu'à 40 % des protéines par rapport à la matière sèche, dans des organites cellulaires dérivés des vacuoles, appelés corps protéiques et en raison de la possibilité de stocker plusieurs années les graines contenant les protéines recombinantes à l'état déshydraté.

Comme propeptide, on peut utiliser un signal d'origine animale ou végétale, les signaux végétaux étant particulièrement préférés, par exemple la pro-sporamine. Le propeptide peut être N-terminal ("N-terminal targeting peptide" ou NTTP), ou C-terminal (CTTP). Dans la mesure où les propeptides sont normalement clivés dès l'entrée de la protéine dans la vacuole, ils ne sont pas présents dans la protéine mature.

L'utilisation du peptide signal ou prépeptide peut conduire à la glycosylation de la protéine.

En l'absence de tout signal d'adressage, la protéine est exprimée dans le cytoplasme.

L'invention se rapporte aussi à un vecteur dans lequel est insérée la cassette d'expression telle que définie ci-dessus. Ce vecteur peut être un plasmide qui peut en outre comprendre un gène marqueur permettant de distinguer une plante transformée d'une plante qui ne contient pas l'ADN étranger transféré. Ainsi, conformément à l'invention, le vecteur

5 peut inclure comme gène marqueur, aussi bien des gènes de sélection qui confèrent une résistance à un antibiotique ou à un herbicide, que des gènes rapporteurs. Parmi les gènes de sélection utilisables, on peut citer :

- le gène *sul* conférant la résistance à l'herbicide sulfonamide Asulam (WO 98/49316),
- le gène *nptII* conférant la résistance à la kanamycine (Bevan *et al.*, 1983),
- 10 - le gène *hph* conférant la résistance à l'hygromycine (Herrera-Estrella *et al.*, 1983),
- le gène *bar* conférant la tolérance au bialaphos (White *et al.*, 1990),
- le gène EPSPS conférant la tolérance au glyphosate (US 5,188,642),
- le gène HPPD conférant la tolérance aux isoxazoles (WO 96/38567),
- le gène de la chloramphénicol acétyl transférase (CAT) qui détoxifie le chloramphénicol.

15 De même, on peut citer comme gènes rapporteurs :

- le gène codant pour l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (GUS),
- le gène de la protéine de fluorescence verte GFP qui permet de visualiser, sous UV, les cellules transformées,

Conformément à l'invention, comme vecteur de clonage ou d'expression

20 comprenant le fragment, on peut citer les vecteurs comprenant une séquence d'ADN contenant au moins une origine de réplication telle que des plasmides, des cosmides, des bactériophages, des virus etc... Les plasmides sont néanmoins préférés.

L'invention concerne aussi les hôtes cellulaires, notamment bactériens, contenant

25 les vecteurs ci-dessus mentionnés.

L'invention propose également un procédé de production de plantes transgéniques comprenant, entre autres, les étapes de :

- transformation de cellules de plante avec un vecteur d'expression contenant un
- 30 fragment d'acide nucléique de la présente invention,
- sélection des cellules transformées,
- génération des plantes transformées à partir de ces cellules, exprimant le fragment d'acide nucléique inséré.

La transformation des plantes selon l'invention peut être réalisée par différentes méthodes, connues de l'homme du métier. On peut citer, tout d'abord, les méthodes de transfert direct de gènes telles que la micro-injection dans des cellules d'embryon de la plante (Neuhaus et Coll., 1987) ou l'électroporation (Chupeau et Coll., 1989), la précipitation directe  
5 avec le polyéthylèneglycol (Schocher et Coll., 1986) ou le bombardement par canon à particules (Mc Cabe et Coll., 1988).

On peut aussi infecter la plante par une souche bactérienne notamment d'*Agrobacterium tumefaciens* selon une méthode éprouvée (Schell et Van Montagu, 1983) ou d'*Agrobacterium rhizogenes* notamment pour les espèces récalcitrantes à la transformation  
10 (Chilton et Coll., 1982). La souche bactérienne peut comporter le gène codant pour l'enzyme MIPP végétale, sous le contrôle d'éléments assurant l'expression dudit gène. La souche bactérienne pourra être transformée par un vecteur dans lequel est insérée une séquence codant ladite enzyme sous le contrôle d'éléments assurant son expression. Cette séquence est insérée par exemple dans un vecteur binaire tel que pBIN19 (Bevan, 1984) ou pMON 505  
15 (Horsch et Klee, 1986) ou tout autre vecteur binaire dérivé des plasmides pTi et pRi. Elle peut aussi être utilement introduite par recombinaison homologue dans un plasmide pTi ou pRi désarmé, tel que pGV 3850 (Zambryski et Coll., 1983) avant la transformation de la plante.

Il a été montré récemment que des plantes monocotylédones telles que le riz et le maïs pouvaient être avantageusement transformées par *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et al.*  
20 1994, Ishida *et al.*, 1996).

Selon une méthode préférée de l'invention, les fragments d'acides nucléiques sont introduits dans les cellules par bombardement de particules recouvertes par lesdits fragments. Le bombardement de particules offre l'avantage d'une transformation rapide. Généralement les embryons immatures ne subissent qu'un unique bombardement. Toutefois un  
25 bombardement répété peut augmenter la fréquence de transformation (WO 98/49316).

Après l'étape de transformation, les cellules transformées sont sélectionnées selon les marqueurs phénotypiques utilisés dans le vecteur. Cette sélection s'effectue sur un milieu contenant un agent sélectif approprié. Les cellules transformées ainsi sélectionnées sont alors cultivées et les plantes sont régénérées. Une extraction d'ADN et un Southern blot avec des  
30 sondes spécifiques du gène d'intérêt permettent de confirmer la transformation. Les méthodes permettant d'isoler l'ADN à partir de matériels biologiques en culture et de vérifier la présence de l'insert sont bien connues de l'homme du métier, elles sont, entre autres, décrites par Southern *et al.*, 1975 et Mullis *et al.*, 1987.

La présente invention a plus particulièrement pour objet un procédé pour accroître l'activité phytasique d'une plante, caractérisé en ce qu'on induit une surexpression d'une MIPP, plus particulièrement de maïs, de riz ou de blé, dans ladite plante à l'aide d'une cassette d'expression telle que décrite auparavant et selon le procédé précédent.

5 On entend ici par "surexpression" aussi bien une augmentation du taux de MIPP par rapport au taux exprimé dans une plante normale, qu'une expression ectopique de cette enzyme, dans un tissu ou un compartiment et/ou à un stade de développement où celle-ci n'est normalement pas exprimée.

10 Conformément à la présente invention, la séquence étrangère peut être hétérologue, c'est-à-dire qu'elle provient d'une plante différente de la cellule hôte. Il peut aussi s'agir d'une séquence de la MIPP naturellement produite par la plante.

La présente invention a également pour objet des hôtes végétaux, consistant en des plantes ou organes végétaux, transformés avec un ou plusieurs acides nucléiques de l'invention et selon le procédé défini ci-dessus. Si la transformation implique plusieurs gènes  
15 d'intérêt, alors ceux-ci peuvent être insérés dans une même cassette d'expression ou alors dans des cassettes d'expression différentes.

Le terme de 'hôtes végétaux' englobe aussi bien les plantes que les cellules de plantes ou les différentes parties de la plante, telles que semence, fruit ou feuille.

20 On peut citer, comme exemples de plantes transgéniques selon l'invention, les céréales, notamment le maïs, le blé, l'orge, le sorgho, le seigle, le riz, préférentiellement le maïs, ainsi que le pois, le soja et la pomme de terre.

Ces plantes transgéniques de l'invention englobent aussi bien les plantes de première génération, que leurs descendants (lignées ou hybrides, notamment).

25 La présente invention a plus particulièrement pour objet des hôtes végétaux transgéniques dans lesquels une MIPP végétale, plus particulièrement de maïs, de blé ou de riz, peut être exprimée dans une partie de la plante ou un compartiment cellulaire où cette enzyme n'est pas produite naturellement ou seulement en faibles quantités. Ces hôtes végétaux sont caractérisés par un génome dans lequel on a introduit une cassette d'expression selon l'invention comportant des séquences régulatrices qui induisent une expression  
30 spécifique dans ladite partie de la plante ou ledit compartiment cellulaire. L'hôte végétal en question est avantageusement une céréale et plus avantageusement encore le maïs, le blé et le riz, ou leurs organes.

La présente invention concerne plus précisément une plante transgénique, selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle produit des semences transgéniques exprimant une quantité accrue d'enzymes à activité phytasique.

La présente invention comprend également les semences de cette plante transgénique et notamment les semences comportant une teneur en MIPP végétale accrue, obtenue par expression spécifique d'une des séquences d'acide nucléique selon la présente invention, dans la semence.

Par ailleurs, la farine et tout produit susceptible d'être obtenu à partir de cette semence font aussi partie de l'invention.

Enfin, la présente invention a pour objet une composition pour l'alimentation humaine ou animale comprenant des semences, une farine de semences ou une MIPP végétale, produites selon la présente invention.

Selon un mode de réalisation, les acides nucléiques définis par l'invention peuvent être utilisés comme marqueur du phénotype lié à l'expression de protéines MIPP.

L'invention permet l'utilisation des fragments nucléotidiques comme marqueurs moléculaires dans des programmes de culture, notamment dans la sélection de variétés exprimant une protéine MIPP ou une plante transformée avec une séquence codant pour cette MIPP.

Selon la présente invention, ces séquences permettent l'obtention des ADN génomiques par des méthodes connues de l'homme du métier, par exemple par le criblage de banques génomiques suivant les indications de Sambrook *et al.* (1989, Molecular cloning : a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). De même au moyen de sondes dégénérées elles permettent l'identification de gènes codant pour des protéines homologues aux MIPP végétales.

Les plantes transgéniques exprimant la MIPP végétale selon l'invention ou l'enzyme elle-même peuvent être utilisées à des fins variées, dans toute situation où l'activité phytasique de cette enzyme est nécessaire ou désirée.

La MIPP végétale est ainsi utile dans les procédés de préparation alimentaire ou dans les procédés d'extraction de l'amidon (procédé de trempage). Par exemple, avec cette enzyme, il est possible d'augmenter l'extractibilité des amidons des grains où elle s'exprime. Le phytate fait précipiter les protéines avec l'amidon de sorte que si l'on réduit le taux de phytate, l'extraction de l'amidon s'en trouve facilitée. L'ajout d'une enzyme à activité

phytasique aux grains de plantes à partir desquels on souhaite extraire l'amidon permet de pallier la précipitation des protéines par les phytates.

Une plante transformée avec une séquence codant pour une MIPP végétale selon le procédé défini par l'invention, ou une partie de celle-ci, peut être utilisée pour améliorer la digestibilité du phytate, dans la ration alimentaire d'animaux monogastriques, et par conséquent, réduire le taux de phytate dans le fumier ou lisier.

L'activité phytasique de la MIPP végétale peut être également mise à profit pour valoriser les eaux de trempage récupérées ou les eaux de brassage, lors de préparations alimentaires. En particulier, la disponibilité accrue du phosphore rend ces eaux très utiles comme additifs pour milieux de culture ou supports de fermentation.

En outre, l'activité phytasique générée permet une meilleure récupération de l'inositol et de ses dérivés à partir des eaux de trempage ou de brassage.

L'invention concerne également l'utilisation d'une MIPP végétale selon l'invention ou l'utilisation de tout ou partie de plantes contenant une MIPP selon l'invention, à des fins thérapeutiques ou diététiques, notamment pour la production de myo-inositol et/ou pour la diminution de l'acide phytique.

L'acide phytique a été tenu pour responsable de certains impacts sur la santé humaine tels que la malformation des os, l'ostéoporose et les anémies causées par des carences en fer, ou des interférences avec l'assimilation du calcium, du magnésium et du zinc (Berlyne et al., 1973; Shan et al., 1979).

Le myo-inositol, forme nutritionnelle active de l'inositol, est un constituant du phospholipide phosphatidylinositol. Il est connu pour ses vertus dans le domaine de la santé. On lui a souvent attribué des effets sur la diminution de la concentration des triglycérides et du cholestérol dans le sang, et plus généralement pour la protection contre les maladies cardiovasculaires. De plus, il est reconnu que les composés issus d'un phospholipide tel que le myo-inositol ont des effets bénéfiques sur l'insomnie et l'anxiété. Par ailleurs, la névropathie périphérique du diabétique est une des complications les plus paralysantes du diabète. Or, on suppose depuis déjà plusieurs années qu'une diminution du taux de myo-inositol est associée aux dégâts des fibres nerveuses des diabétiques souffrant d'une telle complication.

L'invention concerne enfin l'utilisation de la MIPP végétale, selon l'invention, pour libérer le phosphate inorganique directement assimilable par les monogastriques (Pointillard, 1994) et/ou améliorer la disponibilité des cations chélatés par la phytine tels que le fer, le calcium, le magnésium ou le zinc. Ceci évite des ajouts de compléments dans les rations animales et permet d'augmenter la valeur nutritive de la graine.



## **LEGENDES DES FIGURES**

La Figure 1 représente un alignement des séquences nucléiques codant pour les  
5 MIPP de maïs et de riz.

La Figure 2 représente un alignement des séquences protéiques de MIPP de riz et de maïs.

La Figure 3 représente une comparaison des séquences d'acides aminés des MIPP de riz et de maïs avec des MIPP animales, des phosphatases acides et des phytases fongiques

10 La Figure 4 est une carte de restriction du plasmide pRD-257.

La Figure 5 est une carte de restriction du plasmide p3214.

La Figure 6 est une carte de restriction du plasmide pBIOS 421.

La Figure 7 est une carte de restriction du plasmide pBIOS 422.

## **LISTE DES SEQUENCES**

SEQ ID N°1 : Séquence nucléique d'ADNc isolé de maïs

SEQ ID N°2 : Séquence d'acides aminés d'une protéine MIPP de maïs (ZmMIPP)

SEQ ID N°3 : Séquence nucléique d'ADNc isolé de riz

SEQ ID N°4 : Séquence d'acides aminés d'une protéine MIPP de riz (OsMIPP)

20 SEQ ID N°5 : Oligonucléotide 5'olZMP1 utilisé comme amorce 5' pour l'obtention de l'ADNc ZmMIPP.

SEQ ID N°6 : Oligonucléotide 3'olZMP utilisé comme amorce 3' pour l'obtention de l'ADNc ZmMIPP.

SEQ ID N°7 : Oligonucléotide interne olMIPP1.

25 SEQ ID N°8 : Oligonucléotide interne olMIPP2.

SEQ ID N°9 : Oligonucléotide 5'olOSP utilisé comme amorce 5' pour l'obtention de l'ADNc OsMIPP.

SEQ ID N°10 : Oligonucléotide 3'olOSP utilisé comme amorce 3' pour l'obtention de l'ADNc OsMIPP.

30 SEQ ID N°11 : Oligonucléotide 5'olOSP1 utilisé comme amorce 5' pour l'obtention de l'ADNc OsMIPP.

SEQ ID N°12 : Oligonucléotide olMIPP9 utilisé comme amorce 3' pour l'obtention de l'ADNc codant pour une MIPP de blé.

SEQ ID N°13 : Oligonucléotide olMIPP10 utilisé comme amorce 3' pour l'obtention de

l'ADNc codant pour une MIPP de blé.

SEQ ID N°14 : Séquence nucléique de l'EST 3'TaMIPP.

SEQ ID N°15 : Peptide signal putatif

SEQ ID N°16 : Peptide signal putatif

5 SEQ ID N° 17 : Séquence nucléique d'ADNc isolé de maïs

SEQ ID N° 18 : Séquence d'acides aminés d'une protéine MIPP de maïs (ZmMIPP)

## 10 **EXEMPLES**

### **EXEMPLE 1 : Isolement des clones d'ADNc codant pour une protéine MIPP végétale.**

Les séquences de MIPP végétales peuvent être obtenues en réalisant une étude de  
15 bioanalyse à partir de séquences codant pour des MIPP animales, présentées par Caffrey *et al.*  
(1999). Ces séquences permettent ainsi de définir des homologies avec des séquences ADNc  
référéncées, par exemple, dans des bases de données spécifiques au maïs, au blé et au riz. En  
identifiant les EST spécifiques aux séquences homologues desdites séquences animales, des  
oligonucléotides peuvent alors être définis et utilisés comme amorces pour isoler par PCR ces  
20 ADNc d'intérêt à partir de banques d'ADNc ou d'ADNc.

#### **1.1 - MIPP de maïs (ZmMIPP)**

##### **1.1.1 - Choix de la variété**

Deux lignées de *Zea Mays* ont été utilisées : la lignée B73 et l'hybride HiII (un de  
25 ses parents étant la lignée B73). L'extraction d'ARN totaux a été réalisée sur des feuilles  
immatures pour la lignée B73 et sur des cals pour l'hybride HiII (Armstrong *et al.*, 1991)

#### **Conditions de culture**

##### Feuilles immatures

30 40 graines B73 sont mises dans du terreau et placées en serre. Pour la récolte des  
feuilles immatures, on attend le stade où 7-8 feuilles sont visibles soit environ 3-4 semaines  
en serre. Les feuilles immatures sont encore dans le cornet. Un prélèvement à 3 semaines et à  
4 semaines a été effectué.

Des feuilles immatures ont été également prélevées à 2 semaines après germination.

### Obtention de cals de type II

Le prélèvement des épis est réalisé lorsque les embryons immatures ont atteint une taille de 1,5 mm à 2 mm c'est à dire 10 jours après la fécondation. Les épis récoltés sont débarrassés de leurs spathes et de leurs soies puis sont désinfectés au Domestos® 20% (v/v) pendant 15 minutes sous agitation. Les épis sont rincés trois fois à l'eau stérile. La partie supérieure du grain est coupée de façon à découvrir l'albumen, puis une légère pression sur le grain permet de dégager l'albumen. L'embryon immature qui se trouve encore dans le grain est extrait puis déposé sur le milieu de callogénèse N6P6 (Sels N6 3,98 % (p/v) (Sigma C1416) ; vitamines N6 5ml/L ; L-proline 0,7 % (p/v) ; hydrolysate de caséine 0,1 % (p/v) ; saccharose 20 % (p/v) ; 2,4-D 0,001 % (p/v) ; phytage 2,5 % (p/v), pH 5,8) en l'orientant côté plat sur la gélose. Les embryons sont mis en culture pendant 15 jours en chambre de culture à 26°C et à l'obscurité. Les embryons sont séparés de leur radicule puis repiqués sur un nouveau milieu N6P6. Le cal qui prolifère est repiqué toutes les 2 à 3 semaines sur milieu N6P6 (boîte de 16 cal). Les cals sont multipliés en chambre de culture à 26 °C et à l'obscurité.

#### 1.1.2. - Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc

L'extraction des ARN totaux a été réalisée selon la méthode décrite par Verwoerd *et al.* (1989).

Pour chaque tissu deux extractions d'ARN totaux ont été faites.

Pour la synthèse du premier brin d'ADNc, les consignes données dans le kit SMART PCR cDNA synthesis Kit, commercialisé par Clontech, ont été suivies.

#### 1.1.3 - Isolement d'un clone d'ADNc ZmMIPP de maïs

Les oligonucléotides, utilisés comme amorces PCR pour le criblage des ADNc sont présentés en annexe.

Les oligonucléotides ont été déterminés à partir des séquences nucléiques des ESTs identifiés en bioanalyse comme étant fortement homologues aux séquences codant pour des MIPP animales. Les oligonucléotides qui encadrent la séquence codante du gène ZmMIPP, possèdent des sites de restriction en 5' : *NcoI* ou *NdeI* et en 3' : *BamHI*, ceci pour permettre le clonage orienté dans le vecteur d'expression bactérien pET-14b (Novagen). Les oligonucléotides internes olMIPP1 et olMIPP2 (SEQ ID N° 7 et 8), qui servent à vérifier l'identité des séquences, n'en ont pas.

### Amplification PCR

La manipulation a été répétée sur deux pools différents d'ARN totaux pour une même espèce et un même tissu.

La réaction d'amplification a été réalisée directement sur le premier brin d'ADNc synthétisé à partir des ARN totaux.

5 Le couple d'oligonucléotides 5'olZMP1-3'olZMP (SEQ ID N° 5 et 6) sur les ADNc de feuilles immatures et de cals a permis l'amplification d'un fragment de 1,6 kb. Sur ce fragment, une PCR a été réalisée avec les couples d'oligonucléotides 5'olZMP1-olMIPP2 (SEQ ID N° 5 et 8), et olMIPP1-3'olZMP (SEQ ID N°7 et 6), olMIPP1 et olMIPP2 étant des oligonucléotides internes spécifiques de la séquence consensus RHGXRXRP, générant  
10 respectivement une amplification à 0,2 kb et 1,4 kb. Ce résultat montre la présence du site RHGXRXRP dans le fragment de 1,6 kb. Par conséquent, il a été cloné dans pGEM-T (Promega) et séquencé.

#### 1.1.4 - Déduction de la séquence d'acides aminés et analyse

15 La séquence d'acide nucléique et la séquence d'acides aminés sont présentées en annexe, respectivement par SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2. Elles sont valables pour le clone d'ADNc de feuilles immatures et le clone d'ADNc de cals de maïs. En effet le séquençage a montré qu'elles sont identiques. L'analyse des séquences nucléotidiques a été réalisée avec le logiciel MAC VECTOR™ 6.5.3 – Oxford Molecular.

20 *Caractéristiques biochimiques de ZmMIPP (par le logiciel MAC VECTOR™ 6.5.3 – Oxford Molecular)*

Masse moléculaire calculée	58,6 kDa
pI	8,95

25 *Avec les logiciels de détection de motifs protéiques (SEQWEB version 1.1 - Wisconsin Package Genetic Computer Group), identification de :*

- un peptide signal putatif de 25 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine : MGMAAPRAPLPLPQLLLLLVAALLA (SEQ ID N°15)
- 30 - un signal de rétention putatif dans le réticulum endoplasmique à l'extrémité C-terminale de la protéine : KTEL

## 1.2 - MIPP de Riz (OsMIPP)

### 1.2.1 - Choix de la variété

Le matériel végétal est *Oryza sativa japonica*, variété Nipponbare. L'extraction d'ARN est réalisée à partir de cals de riz.

### Conditions de culture :

5 Induction des cals de riz. Les grains de riz à maturité sont débarrassés de leurs enveloppes externes, désinfectés 1 min dans l'éthanol 70% (v/v) et 30 min dans le domestos 50% (v/v). Les grains sont rincés dans de l'eau distillée stérile et déposés sur le milieu N6P6 contenu dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont scellées et placées 21 jours dans l'étuve à 28°C à l'obscurité. A partir du scutellum de l'embryon, un cal primaire se développe. Autour  
10 du cal primaire, des petites unités embryogènes s'individualisent, elles sont transférées dans des boîtes de Pétri contenant le milieu N6P6 et incubées pendant 14 jours à 28°C et à l'obscurité. Pendant cette période, leur taille va augmenter. Les cals sont ensuite prélevés pour l'extraction d'ARN.

#### 1.2.2 – Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc

15 L'extraction d'ARN totaux a été réalisée selon la méthode décrite par Verwoerd *et al.* (1989).

A partir des cals, deux extractions d'ARN totaux ont été réalisées.

Pour la synthèse du premier brin d'ADNc, les consignes données dans le kit SMART PCR cDNA synthesis Kit, commercialisé par Clontech, ont été suivies.

20

#### 1.2.3 - Isolement d'un clone d'ADNc OsMIPP de riz

Les oligonucléotides utilisés ont été déterminés à partir des ESTs identifiés en bioanalyse comme étant fortement homologues aux séquences codant pour des MIPP animales. Les oligonucléotides qui devraient encadrer la séquence codante du gène MIPP,  
25 possèdent des sites de restriction en 5' : *NcoI* ou *NdeI* et en 3' : *BamHI*, ceci pour permettre le clonage orienté dans le vecteur d'expression bactérien pET-14b. Les oligonucléotides internes qui servent à vérifier l'identité des séquences, n'en ont pas.

### Amplification PCR :

30 La manipulation a été répétée sur deux pools différents d'ARN totaux pour une même espèce et un même tissu.

La réaction d'amplification a été réalisée directement sur le premier brin d'ADNc synthétisé à partir des ARN totaux.

La réaction d'amplification avec les couples d'oligonucléotides 5'olOSP-3'olOSP (SEQ ID N° 9 et 10) ou 5'olOSP1-3'olOSP (SEQ ID N° 11 et 10) sur les ADNc de cals génère un fragment de 1,6 kb. Sur ce fragment, une PCR a été réalisée avec les couples d'oligonucléotides 5'olOSP1-olMIPP2 et olMIPP1-3'olOSP, olMIPP1 et olMIPP2 étant des  
5 oligonucléotides internes, générant respectivement une amplification à 0,2 kb et 1,4 kb. Ce résultat montre la présence du site RHGXRXP dans le fragment de 1,6 kb. Par conséquent, il a été cloné dans pGEM-T (Promega) et séquencé.

#### 1.2.4 - Déduction de la séquence d'acides aminés et analyse

10 La séquence d'acide nucléique et la séquence d'acides aminés sont en annexe, respectivement par SEQ ID N° 3 et 4.

#### *Caractéristiques biochimiques de OsMIPP :*

15	Masse moléculaire calculée	56,5 kDa
	pI	8,3

#### *Avec les logiciels de détection de motifs protéiques, identification de :*

- un peptide signal putatif de 18 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la protéine : MAAPRTPLPLVLLLVSA (SEQ ID n°16)
- un signal de rétention dans le réticulum endoplasmique à l'extrémité C-terminale de la  
20 protéine : KSEL

### **1.3 – Analyse des séquences protéiques déduites des clones d'ADNc OsMIPP et ZmMIPP**

#### 1.3.1 - Comparaison OsMIPP et ZmMIPP

25 Les séquences protéiques des protéines MIPP de riz et de maïs sont fortement homologues entre elles. Les résultats de cet alignement, obtenu au moyen du logiciel MAC VECTOR™ 6.5.3 – Oxford Molecular, sont présentés en annexe, figure 1.

#### 1.3.2 - Comparaison entre OsMIPP/ZmMIPP et phosphatases acides

30 Une bioanalyse avec les séquences protéiques clonées par les ADNc, comme précédemment, met en évidence des homologues avec deux familles de phosphatases acides : les MIPP animales et les phytases fongiques. Les résultats de cette étude sont présentés en annexe, figure 3.

Les MIPP sont des protéines décrites uniquement dans le domaine animal. Ces protéines hydrolysent les composés inositol polyphosphate, particulièrement les tétra-, penta-, et hexa-inositol phosphate, par conséquent l'acide phytique (Craxton *et al.*, 1997). Ceci suggère que les ADNc de maïs et de riz ainsi clonés codent pour des enzymes homologues des MIPP animales, avec notamment une activité phytasique.

#### 1.4 – Obtention de l'ADNc codant pour une MIPP de blé

La comparaison des caractéristiques biochimiques des MIPP de riz et de maïs avec la phytase de blé met en évidence des similarités :

	Riz*	Maïs*	Blé° (Johansen <i>et al.</i> , 1997)
Masse moléculaire kDa	56.5 ± 2.5	58.6 ± 3.5	47
pI	8.3	8.95	7.4-8.2

\* valeurs calculées.

° valeurs apparentes.

De plus, il a été constaté que les MIPP des plantes sont homologues aux MIPP animales et aux phytases fongiques, protéines pour lesquelles une activité phytasique est décrite.

Ces deux constatations montrent fortement que la phytase de son du grain de blé est une MIPP.

Les grains de blé *Triticum aestivum* à différents stades de développement : 10, 20, 30 et 40 jours après anthèse (JAA) ont été utilisés comme matériel végétal.

Chez le blé, la fécondation a lieu dans la fleur encore fermée, par conséquent elle n'est pas visible. Lorsqu'elle a eu lieu, les anthères apparaissent, c'est la floraison. Cette étape correspond également à la fin de l'anthèse ou développement des anthères. C'est à partir de ce moment que sont comptés les jours correspondant à la période de développement du grain.

Les auteurs de l'invention réalisé une cinétique de l'activité phytasique d'une fraction du grain enrichie en son au cours du développement à 10, 20, 30 et 40 JAA. Cette activité phytasique augmente au cours du développement du grain. Cette augmentation peut s'expliquer par une activation des enzymes et/ou par une accumulation des enzymes dans le son au cours du développement du grain.

L'extraction des ARN totaux a ensuite été effectuée pour les 4 stades : 10, 20, 30, 40 JAA. Des cinétiques d'expression, c'est à dire des Northern blots, avec la sonde OsMP

(nucléotide 105 au nucléotide 1506 – séquence correspondant aux 467 acides aminés de la partie C-terminale de la protéine) ou la sonde ZmMP nucléotide 1 au nucléotide 1572 – (séquence correspondant aux 524 acides aminés de la protéine), ont été réalisées sur les ARN totaux extraits à partir de son de grain prélevé à 10, 20, 30 et 40 JAA.

5 Par ailleurs, les ADNc correspondant aux ARN totaux extraits de son prélevé aux 4 stades de développement du grain, ont été synthétisés.

L'isolement de l'ADNc MIPP de blé est effectué par RT-PCR ou par RACE-PCR. Les oligonucléotides utilisés pour les réactions d'amplification, sont déterminés à partir des séquences nucléiques des clones d'ADNc MIPP de riz et de maïs dans les zones où les  
10 homologues de séquences sont les plus fortes. On peut également utiliser des oligonucléotides dégénérés, déterminés à partir des séquences d'acides nucléiques, notamment celle de riz et de maïs, correspondant aux régions N et C-terminales des MIPP végétales.

Par ailleurs, la séquence nucléique de l'ADNc OsMIPP a été utilisée pour rechercher des séquences homologues dans des bases d'EST de blé *Triticum aestivum*. Un  
15 EST issu d'ADNc de blé a été retenue, elle est nommée 3'TaMIPP (SEQ ID N°14). La séquence protéique déduite de l'EST présente une forte homologie avec les 58 acides aminés de la partie C-terminale de la protéine OsMIPP. Cette EST a été utilisée pour définir deux amorces olMIPP9 et olMIPP10 (SEQ ID N°12, SEQ ID N°13). Ces amorces combinées avec l'amorce Smart II oligonucléotide™ du kit SMART PCR cDNA synthesis Kit (Clontech),  
20 permettent d'isoler par PCR un ADNc codant pour une MIPP de blé. La PCR génère divers fragments qui sont séparés en gel d'agarose, transférés sur une membrane nylon et hybridés avec la sonde ZmMP. Les fragments reconnus par la sonde ZmMP sont homologues à ZmMIPP.

25

## **EXEMPLE 2 : Production des protéines ZmMIPP et OsMIPP** **chez *E.coli* et évaluation de l'activité phytasique des protéines recombinantes**

### **2.1 – Clonage dans le vecteur d'expression pET-14b**

30 Le site de restriction *NdeI*, amené par les oligonucléotides 5'olZMP1 et 5'olOSP1 et le site de restriction *BamHI*, amené par les oligonucléotides 3'olZMP1 et 3'olOSP1, encadrent les ADNc ZmMIPP et OsMIPP. Ils permettent le clonage orienté et en phase des ADNc aux sites de restriction *NdeI* et *BamHI* du vecteur d'expression bactérien pET-14b (Novagen). Les vecteurs obtenus pET-OsMIPP et pET-ZmMIPP ont été vérifiés par



séquençage.

## 2.2 – Production des MIPP chez *E. coli*

La production des protéines se fait selon les recommandations du fournisseur  
5 Novagen. Des bactéries *E. coli* souche BL21(DE3)pLysS ont été utilisées. Le vecteur pLysS permet d'éviter l'expression de la protéine recombinante alors que la production n'a pas été induite et facilite la lyse des cellules car il porte le gène codant pour le lysozyme du phage T7.

Des bactéries *E. coli* souche BL21(DE3)pLysS sont transformées avec les  
vecteurs pET-OsMIPP et pET-ZmMIPP ; ces transformants bactériens servent respectivement  
10 pour la production des protéines OsMIPP et ZmMIPP. Des bactéries *E. coli* souche BL21(DE3)pLysS sont transformées avec pET-14b ; ces transformants bactériens servent de contrôle négatif de production. Des bactéries *E. coli* souche BL21(DE3)pLysS sont utilisées également comme contrôle négatif de production.

15 Chaque transformant bactérien est mis en culture dans 5 ml de milieu LB (milieu de Luria-Bertani) en présence des antibiotiques adéquats à 37°C sous agitation (175 rpm) pendant 15 heures. Deux antibiotiques sont utilisés : la carbénicilline et le chloramphénicol. La résistance au chloramphénicol est apportée par le vecteur pLysS (concentration utilisée : 30 µg/ml). La résistance à la carbénicilline est apportée par le vecteur pET-14b (concentration  
20 utilisée : 50 µg/ml). L'utilisation appropriée d'un ou des deux antibiotiques permet de sélectionner les transformants bactériens qui contiennent les vecteurs pLysS et/ou pET-14b. Un volume de 1 ml de chaque préculture est utilisée pour ensemençer un volume de 100 ml de milieu LB avec les antibiotiques adéquats contenu dans un erlenmeyer de 500 ml. Les cultures sont incubées à 37°C, sous agitation (175 rpm), jusqu'à ce que la densité optique à  
25 600 nm soit de  $DO_{600nm} = 0,6$ . Lorsque la  $DO_{600nm} = 0,6$  : les 100 ml de milieu LB sont répartis équitablement dans deux erlenmeyer de 250 ml. Le premier sert à la production de protéines. L'induction de la production se fait par ajout de 500 µl d'IPTG 100 mM soit une concentration finale de 1 mM. La production se fait pendant 6 h à 30°C sous agitation (175 rpm). Le second erlenmeyer sert de témoin non induit. Il est incubé 6 h à 30°C sous  
30 agitation (175 rpm).

Après production, la culture bactérienne est centrifugée à 3000 rpm pendant 5 min à 4°C. Le culot bactérien est repris dans un volume de tampon TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) tel que le rapport volume TE / volume culture soit de 1/20. Les bactéries sont stockées à -80°C. Les bactéries sont lysées en deux étapes : une étape de congélation-

décongélation (deux cycles congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  / décongélation à  $37^{\circ}\text{C}$ ), une étape d'ultrasons : 3 fois 15 s, 30 %, 4 pulses / s. Entre chaque cycle, l'échantillon est placé dans la glace. Un cocktail d'inhibiteurs de protéases est ajouté au lysat bactérien, qui contient les protéines bactériennes et les protéines hétérologues, afin de les préserver.

5

### 2.3 – Dosage protéique

La concentration en protéines totales des extraits est évaluée selon la méthode de Bradford (1976). Dans une plaque de microtitration, 2  $\mu\text{l}$  de lysat bactérien sont ajoutés à 200  $\mu\text{l}$  de réactif de Coomassie (Bio-Rad protein assay). Pour le témoin négatif, l'extrait protéique est remplacé par 2  $\mu\text{l}$  de tampon TE pH 8,0. Après homogénéisation, les absorbances sont lues à 595 nm avec un fluorimètre (Labsystems Genesis V2.00) assisté du logiciel (Labsystems). La quantité de protéines est déterminée d'après une courbe étalon réalisée avec de l'albumine de sérum bovin (1 mg/ml).

15

### 2.4 – Analyse des extraits protéiques par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE)

Elle a été réalisée selon la méthode de Laemmli (1970) en suivant les instructions de Bio-Rad.

20

Le gel de séparation est à 10 % de polyacrylamide (acrylamide/bisacrylamide, 29/1, p/v) contenant du Tris-HCl 0,38 M pH 8,8 et du SDS 0,1 (p/v). Le gel de concentration est à 4 % de polyacrylamide contenant du Tris-HCl 0,12 M pH 6,8 et du SDS 0,1 % (p/v). La polymérisation du gel s'effectue en présence de persulfate d'ammonium 0,05 % (p/v) et de Temed 0,078 % (v/v). Une quantité de 40  $\mu\text{g}$  de protéines est utilisée pour l'analyse SDS-PAGE. Les protéines sont reprises dans le tampon de dépôt composé de Tris-HCl 30 mM, pH 6,8, de glycérol 12,5 % (v/v), de SDS 1 % (p/v), de bleu de bromophénol 0,005 % (p/v), en présence de dithiothréitol 100 mM et/ou de 2-mercaptoéthanol 360. Les échantillons sont incubés à  $100^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes avant dépôt en gel. Des protéines précolorées BENCHMARK prestained protein ladder (Gibco BRL) sont utilisées comme marqueurs de masses moléculaires. Le tampon de migration est composé de Tris-base 25 mM, de glycine 0,2 M et de SDS 0,1 % (p/v). L'électrophorèse est réalisée à voltage constant 150 volts pendant 1 heure à température ambiante. Après migration, le gel est rincé trois fois 10 minutes dans de l'eau, les protéines sont colorées par une solution de bleu de Coomassie

30

G250 (Bio-Safe Coomassie, Bio-Rad) pendant 1 heure, le gel est ensuite rincé dans l'eau, à température ambiante.

L'analyse SDS-PAGE a été réalisée sur des extraits bactériens bruts. La présence de la protéine hétérologue dans la culture bactérienne après induction de la production est difficile à déterminer. Une analyse par Western blot avec un anticorps approprié permet de confirmer la présence de la protéine hétérologue. En effet, dans ce cas, la protéine hétérologue a l'avantage d'être synthétisée avec un peptide à son extrémité N-terminale. Des anticorps spécifiques de ce peptide sont commercialisés et peuvent être utilisés pour mettre en évidence la protéine hétérologue. Ceci va dans le sens des travaux de Craxton *et al.* (1997) : lors des essais de production chez *E. coli* d'une MIPP animale, la protéine n'a pu être détectée que par immunodétection.

## 2.5 – Evaluation de l'activité phytasique

L'activité phytasique est déterminée par le dosage de phosphate libéré par l'enzyme à partir de phytate de sodium. La mesure de l'activité phytase est réalisée directement sur les lysats bactériens.

Dans un tube Ependorf de 1,5 ml, on mélange 75 µl de lysat bactérien avec 300 µl d'une solution contenant du phytate de sodium 5 mM, de l'acétate de sodium 0,25 M pH 4,8, du  $\text{CaCl}_2$  1 mM. La réaction enzymatique se fait pendant 1 heure à 55°C. Pour chaque essai, un témoin identique est gardé à 0°C pendant l'incubation. Ce témoin utilisé comme zéro, permet d'éliminer les absorbances possibles dues aux extraits protéiques eux-mêmes. La réaction enzymatique est arrêtée par l'ajout de 375 µl d'acide trichloroacétique 20 % (p/v), suivie d'une centrifugation à 8000 rpm pendant 15 minutes et à 4°C qui permet de précipiter les protéines. Le dosage du phosphate libre se fait sur le surnageant. A 750 µl de surnageant, on ajoute 750 µl du réactif suivant :  $\text{FeSO}_4$  0,38 M,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,16 N / molybdate d'ammonium 12 mM,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 N, 1 / 4, v/v. L'absorbance est mesurée à 690 nm. La quantité de phosphate est déterminée à partir d'une courbe standard. L'activité phytasique est exprimée en nmoles de phosphate libéré par heure, par mg de protéines totales à 55°C.

L'activité phytasique a été réalisée sur des extraits bactériens. Une étape de purification de la protéine hétérologue à partir des extraits bactériens bruts est néanmoins préférable pour améliorer l'interprétation des résultats. Ceci est aisément envisageable de part

la présence du peptide à l'extrémité N-terminale de la protéine hétérologue qui permet de la purifier par chromatographie d'affinité.

### **EXEMPLE 3 : Construction de gènes chimériques.**

#### **3.1 – Pour une expression ectopique constitutive de OsMIPP**

Pour obtenir une expression constitutive, le promoteur pCsVMV (Verdaguer *et al.*, 1996, 1998) du virus de la mosaïque de la nervure du manioc est utilisé.

Le construit est réalisé de la façon suivante :

- Le fragment *ClaI-SacII* de 556 pb du vecteur pRD 257 (figure 4) contient le promoteur pCsVMV. Ce fragment est cloné dans le vecteur p3214 (figure 5) digéré par *ClaI* et *EcoRI*. Le vecteur obtenu est nommé vecteur pBIOS 366. Il contient le promoteur pCsVMV et le terminateur *ter nos*.
- L'ADNc OsMIPP a été cloné dans le vecteur pGEM-T (Promega) donnant le vecteur pBIOS 367. Le vecteur pBIOS 367 est digéré par *NotI* générant un fragment de 1563 pb contenant l'ADNc OsMIPP complet. Ce fragment est cloné dans le vecteur pBIOS 366 digéré par *PstI*. On obtient le vecteur pBIOS 368 qui contient la cassette : promoteur pCsVMV, ADNc OsMIPP, terminateur *ter nos*.
- Le vecteur pBIOS 368 est digéré par *XhoI*, ce qui permet de sortir la cassette : promoteur pCsVMV, ADNc OsMIPP, terminateur *ter nos*. Elle est clonée au site *XhoI* du vecteur binaire pBIOS 273. Le vecteur pBIOS 273 contient l'ADN-T d'*Arabidopsis thaliana* dans lequel se trouvent le promoteur pAct1 et le premier intron du gène Act1 de riz, la séquence codante du gène *bar* et le terminateur *nos*. Le vecteur obtenu est le vecteur pBIOS 369. Le vecteur pBIOS 369 comporte d'une part l'ADN-T dans lequel se trouvent la cassette d'expression du gène OsMIPP, inséré entre le promoteur pCsVMV et le terminateur *Nos*, la cassette d'expression du gène de sélection, le gène *Bar* inséré entre le promoteur pAct1 et le premier intron du gène Act1 de riz et le terminateur *nos*. D'autre part, pBIOS 369 contient également le gène de la résistance à la spectinomycine et une origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli*

#### **3.2 – Pour une expression ectopique tissu-spécifique de OsMIPP**

Pour obtenir une expression albumen-spécifique, le promoteur pHMWG du gène codant pour une gluténine de masse moléculaire élevée de blé (HMWG : High Molecular Weight Glutenin) est utilisé.

Le construit permettant l'expression de OsMIPP dans le cytoplasme des cellules de l'albumen est réalisé de la façon suivante :

- La digestion par l'enzyme *EcoRI* du vecteur pBIOS 367 génère un fragment de 1547 pb contenant l'ADNc OsMIPP complet. Ce fragment est cloné au site *EcoRI* du vecteur p3214 entre le promoteur pHMWG et le terminateur ter nos. Le vecteur obtenu est appelé vecteur pBIOS 370.
- La digestion du vecteur pBIOS 370 par l'enzyme *XhoI* génère un fragment de 2287 pb qui est cloné au site *XhoI* du vecteur binaire pBIOS 273. Le vecteur obtenu est nommé pBIOS 271. Le vecteur pBIOS 371 comporte d'une part l'ADN-T dans lequel se trouvent la cassette d'expression du gène OsMIPP, inséré entre le promoteur pHMWG et le terminateur Nos, la cassette d'expression du gène de sélection, le gène Bar inséré entre le promoteur pAct1 et le premier intron du gène Act1 de riz et le terminateur nos. D'autre part, pBIOS 371 contient également le gène de la résistance à la spectinomycine et une origine de répllication chez *E. coli*.

### **3.3 - Pour une expression ectopique albumen-spécifique de ZmMIPP**

Pour obtenir une expression albumen-spécifique, le promoteur pHMWG du gène codant pour une gluténine de masse moléculaire élevée de blé (HMWG : High Molecular Weight Glutenin) est utilisé.

Le construit permettant l'expression de ZmMIPP dans les cellules de l'albumen est réalisé de la façon suivante :

- La digestion par les enzymes *EcoRI* et *BamHI* du vecteur ZM4 (fragment ZmMIPP dans le vecteur pGEM-T easy) génère un fragment de 1600 pb contenant l'ADNc ZmMIPP complet. Ce fragment est cloné aux sites *EcoRI* et *BamHI* du vecteur P3214 (figure 5) entre le promoteur pHMWG et le terminateur ter NOS. Le vecteur obtenu est appelé vecteur pBIOS 421 et décrit figure 6.
- La digestion du vecteur pBIOS 421 par les enzymes *SacI* et *SalI* génère un fragment de 2335 pb. L'extrémité du fragment de 2335 pb digéré par l'enzyme *SacI* est rendue franche par un traitement à l'exonucléase 3'-5' portée par l'enzyme T4 DNA polymérase de New England Biolabs. Ce fragment est ensuite cloné aux sites *PmeI* et *XhoI* d'un vecteur binaire dérivé de pSB12 (Japan Tobacco, EP 672 752) dans lequel a été insérée une cassette

d'expression du gène de sélection décrite ci-dessus. Le vecteur obtenu est nommé pHMWG-ZmMIPP-JT. Le vecteur pHMWG-ZmMIPP-JT comporte d'une part l'ADN-T dans lequel se trouvent la cassette d'expression du gène ZmMIPP, inséré entre le promoteur pHMWG et le terminateur ter NOS, la cassette d'expression du gène de sélection, le gène Bar (White et al, 1990) inséré entre le promoteur pAct1 et le premier intron Act1 de riz et le terminateur ter NOS. La cassette d'expression du gène de sélection est également insérée entre les éléments transposables Ac/Ds (Lechelt et al, 1989) qui permettent une excision de la cassette de sélection après action d'une transposase. D'autre part le vecteur pHMWG-ZmMIPP-JT contient également le gène de la résistance à la spectinomycine et une origine de répllication chez *E. coli*.

### 3.4 - Pour une expression ectopique embryon-spécifique de ZmMIPP

Pour obtenir une expression embryon-spécifique, et plus particulièrement scutellum-spécifique, le promoteur pHyPRP du gène codant pour une protéine hybride riche en proline de maïs (HyPRP : Hybrid Proline Rich Protein) est utilisé.

Le construit permettant l'expression de ZmMIPP dans les cellules de l'embryon est réalisé de la façon suivante :

- La digestion par les enzymes *ApaI* et *NdeI* du vecteur pBIOS 413 (fragment pHyPRP dans vecteur pBluescript) génère un fragment de 2162 pb contenant le promoteur du gène pHyPRP décrit par Josè-Estanyol et al (1992). Ce fragment est cloné aux sites *ApaI* et *NdeI* du vecteur pBIOS 421 devant l'ADNc ZmMIPP complet et le terminateur ter NOS. Le vecteur obtenu est appelé vecteur pBIOS 422 décrit figure 7.

- La digestion du vecteur pBIOS 422 par les enzymes *SacI* et *ApaI* génère un fragment de 4050 pb. Les extrémités du fragment de 4050 pb sont rendues franches par un traitement à l'exonucléase 3'-5' portée par l'enzyme T4 DNA polymérase de New England Biolabs. Ce fragment est ensuite cloné aux sites *PmeI* et *XhoI* du vecteur binaire pBIOS 342, les extrémités du vecteur étant rendues franches par un traitement avec l'enzyme T4 DNA polymérase de New England Biolabs. Ce fragment est ensuite cloné aux sites *PmeI* et *XhoI* d'un vecteur dérivé de pSB112 (Japan Tobacco EP 672 752) comme décrit dans l'exemple précédent. Le vecteur obtenu est nommé pHyPRP-ZmMIPP-JT. Le vecteur pHyPRP-ZmMIPP-JT comporte d'une part l'ADN-T dans lequel se trouvent la cassette d'expression du gène ZmMIPP, inséré entre le promoteur pHyPRP et le terminateur ter NOS, la cassette d'expression du gène de sélection, le gène Bar inséré entre le promoteur pAct1 et le premier intron Act1 de riz et le terminateur ter NOS. La cassette d'expression

du gène de sélection est également insérée entre les éléments transposables Ac/Ds qui permettent une excision de la cassette de sélection après action d'une transposase. D'autre part le vecteur pHyPRP-ZmMIPP-JT contient également le gène de la résistance à la spectinomycine et une origine de réplication chez *E. coli*.

5

#### **EXEMPLE 4 : Production de maïs transformé**

##### **4.1 - Transformation du maïs par bombardement de particules**

La transformation génétique du maïs par bombardement de particules se fait sur des cellules de cals friables embryogènes ou cals de type II. Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype HiII ou A188 x B73 selon la méthode décrite par Armstrong (1994). Les cals ainsi obtenus peuvent être multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les 15 jours sur le milieu d'initiation. Des plantules sont régénérées à partir de ces cals par modification de l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain *et al.* (1989).

Le transfert des gènes d'intérêt et de sélection par bombardement de particules dans les cals de type II se fait selon le protocole suivant. Quatre heures avant le bombardement, des fragments de cals de type II d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> sont disposés au centre d'une boîte de Pétri contenant le milieu d'initiation additionné de mannitol 0,2 M et de sorbitol 0,2 M, 16 fragments par boîte.

Les vecteurs porteurs des gènes d'intérêt et de sélection sont préparés à l'aide du système CONCERT selon les instructions du fournisseur (GIBCO BRL). Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungstène (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide d'un canon à particules. L'optimisation des conditions de bombardement peut dépendre du type d'appareil utilisé et fait partie des techniques normalement maîtrisées par l'homme de l'art.

Après bombardement, les boîtes sont scellées à l'aide de Scellofrais<sup>®</sup> et placées à l'obscurité à 27°C. Les cals sont transférés sur un milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif 24 h après le bombardement.

Les cals sont maintenus sur ce milieu pendant 3 mois, le milieu est changé tous les 15 jours. Les cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélectif sont habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré

dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cals par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, multipliés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées, toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou auto-fécondées.

#### 4.2- Transformation du maïs par *Agrobacterium tumefaciens*

La transformation du maïs par *Agrobacterium* se fait selon la méthode de Ishida *et al.* (1996).

##### 4.2.1- Obtention du vecteur superbinaire

Le vecteur superbinaire utilisé pour la transformation du maïs est issu de la recombinaison homologe entre deux vecteurs : le vecteur pBIOS 371 et le vecteur pSB1. Le vecteur pBIOS 371, construit comme précédemment (exemple 3.2), comporte d'une part l'ADN-T dans lequel se trouvent la cassette d'expression du gène OsMIPP, inséré entre le promoteur pHMWG et le terminateur Nos, la cassette d'expression du gène de sélection, le gène Bar. D'autre part, pBIOS 371 contient également le gène de la résistance à la spectinomycine et une origine de réplication chez *E. coli*. Le vecteur pSB1 contient les gènes virB, virC et virG du plasmide pTiBo542 présent dans *Agrobacterium* souche A281 (ATCC 37349), le gène de la résistance à la tétracycline, une origine de réplication fonctionnelle chez *E. coli* et *Agrobacterium*. Les vecteurs pSB1 et pBIOS 371 possèdent une région homologe qui leur permet de se recombiner et de générer le vecteur superbinaire pRec 371.

La recombinaison homologe entre les deux vecteurs se fait dans *Agrobacterium*. Le vecteur pBIOS 371 est introduit dans *Agrobacterium* souche LBA4404 contenant le vecteur pSB1 par électroporation en utilisant l'appareil CELL PORATOR Voltage Booster (GIBCO BRL) selon la méthode décrite par Mattanovitch *et al.* (1989) et le protocole donné par le fournisseur (Life Technologies, USA).

Les agrobactéries contenant le vecteur superbinaire pRec 371 sont sélectionnées sur milieu YT en présence de CaCl<sub>2</sub>, de rifampicine et de spectinomycine. Le gène de résistance à la rifampicine est porté par le chromosome bactérien. La résistance à la spectinomycine, portée par le vecteur pBIOS 371 (origine de réplication fonctionnelle chez *E.*



*coli*), ne pourra s'exprimer qu'après recombinaison homologue avec le vecteur pSB1 (origine de réplication fonctionnelle chez *Agrobacterium* et *E. coli*).

Le vecteur superbinaire pRec 371 possède l'ADN-T dans lequel se trouvent les cassettes d'expression du gène Bar et de la séquence OsmIPPs (sous le contrôle du promoteur pHMWG pour une expression tissu spécifique), des origines de réplication fonctionnelles à la fois dans *E. coli* et *Agrobacterium*, les gènes de résistance à la tétracycline et à la spectinomycine, et les gènes de virulence virB, virC et virG du plasmide pTiBo542.

#### 4.2.2 – Méthode de transformation du maïs et régénération des plantes transformées

Des embryons immatures sont co-cultivés avec *A. tumefaciens* souche LBA 4404, contenant le vecteur superbinaire pendant 5 minutes, puis placés sur un milieu d'initiation de la callogenèse pendant 5 jours à l'obscurité et à 25°C.

Les cals transformés sont sélectionnés sur un milieu de culture contenant l'agent sélectif et l'agent bactériostatique, la céfotaxime. Des cals de type I sont obtenus, à partir de ceux-ci, des plantules vont être régénérées sur un milieu culture contenant l'agent sélectif et l'agent bactériostatique, la céfotaxime. Les plantules ayant régénéré sont ensuite transférées sur un milieu de développement contenant l'agent sélectif.

Les plantes obtenues sont acclimatées au phytotron, puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou auto-fécondées.

### 4.3 – Le gène Bar

La nature et la concentration de l'agent sélectif peuvent varier selon le gène utilisé. Les agents sélectifs utilisables sont généralement des composés actifs de certains herbicides (Basta<sup>®</sup>, Round up<sup>®</sup>) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine,).

Le gène Bar de *Streptomyces hygroscopicus* code pour une phosphinothricine acétyl transférase (PAT) qui inactive par acétylation la phosphinothricine - molécule active de l'herbicide Basta<sup>®</sup>. Les cellules portant ce gène sont donc rendues résistantes à cet herbicide et peuvent être sélectionnées par son intermédiaire.

Pour la transformation des céréales, la séquence codante du gène Bar est sous le contrôle d'une région régulatrice permettant une expression forte et constitutive dans les cellules végétales. Une telle région peut avantageusement être constituée par le promoteur et le premier intron du gène Actine 1 de riz (Mc Elroy *et al.*, 1991).

#### 4.3.1 – Utilisation du gène Bar dans la transformation par bombardement de particules

Le gène chimérique, composé du promoteur et du premier intron du gène Actine 1 de riz et du gène Bar, est cloné dans le plasmide pDM 302 permettant sa multiplication chez *E. coli* (Cao *et al.*, 1992). Les milieux de cultures destinés à la sélection des cellules transformées sont additionnés de phosphinothricine 2 mg/l.

Pour l'introduction des construits OsMIPP devant conduire à une expression ectopique des protéines issues des gènes OsMIPP, une technique dite de cotransformation peut avantageusement être utilisée. On procède à une coprécipitation des deux plasmides (le plasmide porteur du gène Bar et le plasmide porteur du gène OsMIPP) sur les particules de tungstène, la quantité totale d'ADN précipité sur les particules restant identique à ce qu'elle est dans le protocole standard (5 µg d'ADN pour 2,5 mg de particules), chaque plasmide représentera environ la moitié du total d'ADN utilisé.

L'expérience montre qu'avec cette méthode, la cointégration des plasmides dans les cellules végétales est l'événement le plus fréquent (de l'ordre de 90 %) c'est-à-dire que pratiquement chaque plante ayant intégré le gène Bar et ayant été sélectionnée par son intermédiaire portera aussi le gène MIPP. Ainsi, le pourcentage de plantes sélectionnées exprimant le gène OsMIPP est d'environ 70 %.

Les gènes ainsi introduits sont généralement liés au sens génétique, le gène OsMIPP peut ainsi avantageusement être suivi dans les descendance grâce à la résistance à l'herbicide qui lui est étroitement associée.

#### 4.3.2 - Utilisation du gène Bar dans la transformation par bombardement de particules

Le vecteur superbinaire pRec 371 possède l'ADN-T dans lequel se trouvent les cassettes d'expression des gènes Bar et OsMIPP, des origines de réplication fonctionnelles à la fois dans *E. coli* et *Agrobacterium*, les gènes de résistance à la tétracycline et à la spectinomycine, et les gènes de virulence virB, virC et virG du plasmide pTiBo542.

Des embryons immatures sont co-cultivés avec *A. tumefaciens* souche LBA 4404, contenant le vecteur superbinaire pRec 371 pendant 5 minutes, puis placés sur un milieu d'initiation de la callogenèse pendant 5 jours à l'obscurité et à 25°C. La sélection des cals de type I transformés et la régénération des plantules se fait sur un milieu contenant de la phosphinotricine 5 à 10 mg/l et un agent bactériostatique, la céfotaxime. Le développement des plantules se fait sur un milieu contenant uniquement la phosphinotricine.

Les cals et les plantes qui ont intégré dans leur génome, l'ADN-T qui contient le gène OsMIPP et le gène Bar, peuvent être suivis dans les descendance grâce à la résistance à l'herbicide.

#### 4.4 - Mesure de l'activité phytasique du maïs transformé

L'objectif final de la production de maïs transformé avec le gène OsMIPP étant l'obtention d'une activité phytasique accrue, des mesures d'activité enzymatique sont prévus. Le dosage de l'activité phytasique se fait selon la méthode décrite précédemment dans l'exemple 2 paragraphe 2.5. L'activité phytasique est mesurée sur les extraits protéiques de différents organes de maïs transgénique et de maïs non transgénique : feuilles, graines, jeunes plantules en cours de germination (5 ou 6 jours de germination). L'extraction des protéines totales à partir de ces tissus se fait selon la méthode décrite ci-après. Les tissus, prélevés et congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , sont broyés à l'état de poudre dans l'azote liquide. Une quantité de 100 mg de poudre végétale broyée est transférée dans 1 ml de tampon d'extraction (acétate de sodium 100 mM, pH 4,8,  $\text{CaCl}_2$  2 mM, DTT 1 mM, cocktail d'inhibiteurs de protéases 0,5 à 1 mM (Roche)). Les échantillons sont homogénéisés pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  et les extraits sont centrifugés à 8000 rpm pendant 20 min à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant contenant les protéines totales, sert à la mesure de l'activité phytasique.

#### EXEMPLE 5 : Production de riz transformé

La production de riz transformé peut être envisagée selon deux méthodes : *via Agrobacterium tumefaciens* selon le protocole décrit par Hiei *et al.* (1994), par bombardement de particules selon le protocole de Fauquet *et al.* (1996). Les vecteurs pBIOS 369 et pBIOS 371 décrits dans l'exemple 3, sont utilisés pour la transformation du riz *via Agrobacterium tumefaciens*.

#### EXEMPLE 6 : Production de blé transformé.

La transformation du blé (*Triticum aestivum*) peut se faire selon la méthode décrite dans le brevet EP 0674 715 B1.

### 6.1 – Préparation des tissus à transformer

Les tissus utilisés pour le transfert de gènes ont été préparés selon la méthode décrite dans le brevet EP 0674 715 B1. Ce sont des cals de type M qui sont utilisés pour le bombardement. Ils peuvent être obtenus à partir d'embryons immatures prélevés des grains immatures de blé et placés sur un milieu MS décrit par Murashige et Skoog (1962) contenant du maltose.

### 6.2 – Préparation des vecteurs à transférer

Les vecteurs utilisés pour la transformation du blé sont purifiés sur gradient de Césium puis concentré à 1 mg/ml dans le tampon TE pH 8,0 (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM) (Sambrook *et al.*, 1989).

### 6.3 – Préparation des particules d'or

Des particules d'or de 1 µm sont enrobées d'ADN à transférer selon le procédé de Daines (1990). Les particules sont reprises dans de l'éthanol absolu, 60 mg de particules par ml d'éthanol. Un volume de 35 µl de cette suspension est transféré dans un tube de microcentrifugation de 1,5 ml, les particules sont récupérées par centrifugation à 14 000 g pendant 3 minutes. Elles sont lavées avec 1,5 ml d'eau distillée stérile et récupérées par centrifugation à 14 000 g pendant 3 minutes. Les particules sont reprises dans 25 µl de tampon TE contenant 25 µg du vecteur portant le gène d'intérêt et 25 µg du vecteur portant le gène de sélection, le gène dhfr codant pour l'enzyme dihydrofolate réductase. On ajoute à cette préparation, dans l'ordre : 220 µl d'eau distillée stérile, 250 µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5 M et 50 µl de spermidine 0,1 M. Le mélange est homogénéisé par agitation à 4°C pendant 15 minutes. Le mélange est centrifugé pendant 5 minutes à 14 000 g, le surnageant est éliminé et les particules lavées avec 200 µl d'éthanol absolu. Les particules d'or chargées d'ADN sont reprises dans 36 µl d'éthanol absolu.

### 6.4 – Etape de transformation

Le déroulement du bombardement des cellules s'est effectué telle que la demande de brevet EP 0 674 715 le décrit. Dans la chambre du canon, la boîte de Pétri contenant les explants à bombarder est placée sur la plate-forme au centre de l'ouverture d'où sont projetées les particules d'or enrobées d'ADN ou microprojectiles. Les microprojectiles sont placés sur un support au dessus des explants. La chambre est fermée et scellée, le vide de la chambre est réalisé et le réservoir d'hélium rempli avec une quantité appropriée de gaz. Le bombardement

est déclenché permettant la projection des microprojectiles sur les explants. Les explants sont bombardés deux fois avec les microprojectiles. Après bombardement, les cals sont maintenus à l'obscurité pendant 15 heures puis placés sur le milieu MS pendant 15 jours.

#### 5            **6.5 – Sélection des cals et régénération des plantes transgéniques.**

La sélection des cals transformés se fait le milieu MS contenant l'agent sélectif, le méthotrexate pendant 4 mois.

10           Pour régénérer des plantes, les cals sont transférées sur un milieu MS contenant du 2,4-D à l'obscurité. Quand des structures embryogènes apparaissent, les cals sont transférés sur un milieu MS contenant des hormones (auxines et gibbérellines) à la lumière pendant 15 jours, cette étape permet l'induction de tiges. Les explants sont ensuite transférés sur un milieu MS sans hormone afin de permettre l'induction des racines.

Les plantules sont acclimatées en phytotron avant d'être cultivées en serre.

## REFERENCES

- Anderson *et al.* T.A.G. (1989), 77 : 86-91
- Armstrong *et al.* Maize Genetics Cooperation Newsletter (1991), 65 : 92-93
- 5 - Armstrong *et al.* The Maize Handbook (1994), 665-671
- Barba *et al.*, Cell Mol. Biol. (1997) 43:609-620
- Berlyne *et al.*, Amer. J. Clinical Nutr. (1973), 26: 910-911
- Bevan *et al.*, Nature (1983), 304 : 184-187
- Bevan *et al.* Nucleic Acids Research (1984), 11 : 369-385
- 10 - Bradford. Anal. Biochem. (1976), 72 : 248-254
- Cao *et al.* Plant Cell Reports (1992), 11 : 586-591
- Caffrey *et al.*, FEBS Letters (1999), 442 : 99-104
- Callis *et al.* Genes Dev. (1987), 1 : 1183
- Carrington et Freed. J. Virol. (1990), 64(4) :1590-1597
- 15 - Chi *et al.* Genomics (1999), 56 : 324-336
- Chilton et Coll. Nature (1982), 295 : 432-434
- Christensen *et al.* Plant Mol. Biol. (1992), 18:675-689
- Chupeau et Coll. Biotechnology (1989), 7(5) : 503-508
- Craxton *et al.* Biochem. J. (1997), 328 : 75-81
- 20 - Daines *et al.* Biolistic Systems Newsletter (1990) 1:1-4
- Datla *et al.* Biotechnology Ann. Rev. (1997), 3 : 269-296
- Depicker *et al.* Mol. Gen. Genet. (1992), 235(2-3) : 389-396
- Depigny-This *et al.* Plant Mol. Biol. (1992), 20 : 267-479
- Elroy-Stein *et al.* PNAS USA (1989), 86 : 6126-6130
- 25 - Fauquet *et al.* Biolistic transformation of rice : now efficient and routine for japonica and indica rices. Proc. Third Int. Rice Genet Symp. Ed. G.S. Khush, 153-165
- Franck *et al.* Cell (1980), 21 : 285-294
- Gallie *et al.* Molecular Biology of RNA (1989), 237-256
- Gaubier *et al.* Molecular and General Genetics (1993), 238 : 409-418
- 30 - Gibson et Ullah. Plants (1990), pp. 77-92, Wiley - Liss, New-York.
- Graf E. dir. pub. (1986) Phytic acid, chemistry and applications, Pillsbury Co., Pilatus Press ; Minneapolis, M. N., USA
- Josè-Estanyol *et al.* Plant Cell (1992) 4:413-423
- Herrera-Estrella *et al.* EMBO J. (1983), 2 : 987-995

- Hiei *et al.* The Plant Journal (1994), 6 : 271-282
- Horsch et Klee. Proceeding of the National Academy of Sciences USA (1986), 83 : 4428-4432
- Ishida *et al.* Nature biotechnology (1996), 14 : 745-750
- 5 - Jobling *et al.* Nature (1987), 325 : 622-625
- Johansen *et al.* Fifth International Congress Of Plant Molecular Biology (1997), abstract n° 1268
- Kasuga *et al.* Nature Biotechnology (1999), 17 : 287-291
- Kay *et al.* Science (1987), 236 : 4805
- 10 - Klein *et al.* Nature (1987), 327 : 70-73
- Lechelt *et al.*, Mol. Gen. Genet., (1989), 219:225-234
- Laemmli, Nature (1970), 227 : 680-685
- Maas *et al.* Plant Mol. Biol. (1991), 16 : 199
- Macejack *et al.* Nature (1991), 353 : 90-94
- 15 - Mattanovitch *et al.* Nucleic Acids Research (1989), 17(16) : 6747
- McCabe et Coll. Biotechnology (1988), 6(8) : 923-926
- McCarty *et al.*, Plant Cell, (1989), 1:523-532
- McElroy *et al.* Plant Cell (1990), 2 : 163-171
- McElroy *et al.* Mol. Gen. Genet. (1991), 231: 150-160
- 20 - Morris *et al.* Virology (1992), 187 : 633
- Mullis *et al.* Method in Enzymology (1987), 155-335
- Murashige et Skoog. Physiol. Plant (1962) ; 15 : 473-497
- Neuhaus et Coll. Theoretical and Applied Genet. (1987), 75(1) : 30-36
- O'Dell *et al.* J. Agr. Food. Chem (1972.), 20 : 718-721
- 25 - Ohta *et al.* Plant Cell Physiol. (1990), 31 : 805
- Pointillard, INRA-Production animales, (1994), 7:29-39
- Roberts *et al.* The Plant Cell (1989), 1 : 569-578
- Romano *et al.* J. Cell Sci. (1998), 111(6) : 803-813
- Sambrook *et al.* Molecular Cloning : A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 30 Cold Spring Harbor, NY, (1989)
- Schell et Van Montagu. Mol. Gen. Genet. (1983), 189(3) : 390-399
- Schocher et Coll. Biotechnology (1986), 4 : 1093-1096
- Shan *et al.*, Nutr. Metab. (1979), 23:275-285
- Shen *et al.* Plant Molecular Biology (1994), 26 : 1085-1101

- Snowdon *et al.* Plant Mol. Biol. (1996), 31 : 689
- Southern. Journal of Molecular Biology (1975), 98 : 503
- Vancanneyt *et al.* Molecular and General Genetics (1990), 220 : 245-250
- Vain *et al.* Plant Cell Tissue and Organ Culture (1989), 18 : 143-151
- 5 - Verdaguer *et al.* Plant Molecular Biology (1996), 31(6), 1129-1139
- Verdaguer *et al.* Plant Molecular Biology (1998), 37(6), 1055-1067
- Verwoerd *et al.* Nucleic Acids Research (1989), 17(6) : 2362
- White *et al.* Nucleic Acids Research (1990), 18 : 1062
- Zambryski *et al.* EMBO J. (1983), 2(12) : 2143-2150
- 10 - AU-689311
- EP 0 507 698
- EP 0 633 317
- EP 0 674 715 B1
- US 5,188,642
- 15 - US 5,635,618
- US 5,670,349
- WO 96/38567
- WO 98/05785
- WO 98/45445
- 20 - WO 98/49316



REVENDICATIONS

1. Acide nucléique isolé codant pour une MIPP (Multiple Inositol Polyphosphate Phosphatase) végétale à activité phytasique.
- 5 2. Acide nucléique isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID n°1, n° 3, n° 17 ou une séquence homologue d'une de ces séquences.
3. Acide nucléique isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence homologue de la séquence SEQ ID n°1, n°3 ou n° 17, ladite séquence homologue étant définie comme
  - 10 i) une séquence similaire à au moins 70 % de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 ;  
ou
  - ii) une séquence hybridant avec la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 17 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation, ou
  - iii) une séquence codant pour une enzyme MIPP végétale comprenant la séquence
  - 15 d'acides aminés SEQ ID n°2, n°4 ou n° 18.
4. Acide nucléique isolé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID n° 17 ou une séquence homologue à la séquence SEQ ID n° 17.
5. Enzyme isolée MIPP (Multiple Inositol Polyphosphate Phosphatase) végétale à activité phytasique.
- 20 6. Enzyme isolée MIPP végétale selon la revendication 4, comprenant une séquence d'acides aminés SEQ ID N°2, SEQ ID N°4 ou SEQ ID N° 18.
7. Enzyme isolée selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il comprend la séquence SEQ ID n° 18.
8. Enzyme isolée MIPP végétale selon la revendication 5, comprenant une séquence d'acides aminés similaire à au moins 70% de la séquence SEQ ID N°2, SEQ ID N°4 ou SEQ ID N° 18.
- 25 9. Cassette d'expression contenant au moins une des séquences selon les revendications 1 à 4 placée sous le contrôle d'au moins une séquence régulatrice capable de commander l'expression de la protéine MIPP végétale.
- 30 10. Cassette d'expression selon la revendication 9, caractérisée en ce que la séquence régulatrice est un promoteur.
11. Cassette d'expression selon la revendication 10, caractérisée en ce que le promoteur est spécifique d'un organe ou d'un tissu de la plante.

12. Cassette d'expression selon la revendication 11, caractérisée en ce que le promoteur spécifique est choisi parmi les promoteurs de gènes codant pour une gluténine de masse moléculaire élevée HMWG de blé ou d'orge, la napine, la phaséoline, l'hélianthinine, l'albumine, l'oléosine, GEA1 et GEA6 d'*Arabidopsis thaliana*, la  $\gamma$ -zéine de maïs, le promoteur pHyPRP du gène codant pour une protéine hybride riche en proline de maïs, le promoteur Vp1 du gène Viviparous1 combiné au premier intron Sh du gène Shrunken.
13. Cassette d'expression selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisée en ce qu'une séquence régulatrice comprend un signal d'adressage.
14. Cassette d'expression selon la revendication 13, caractérisée en ce que le signal d'adressage est une séquence codant pour un peptide signal N-terminal.
15. Cassette d'expression selon la revendication 14, caractérisée en ce que le signal d'adressage comporte un signal de rétention endoplasmique à l'extrémité C-terminale.
16. Cassette d'expression selon la revendication 14, caractérisée en ce que le signal d'adressage ne comporte pas de signal de rétention endoplasmique à l'extrémité C-terminale.
17. Vecteur nucléotidique dans lequel est insérée une cassette d'expression telle que définie dans l'une des revendications 9 à 16.
18. Hôte cellulaire contenant un vecteur nucléotidique selon la revendication 17.
19. Procédé de production de plantes transgéniques comprenant les étapes de :
  - transformation de cellules de plante avec une séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 1 à 4 ou un vecteur selon la revendication 17,
  - sélection des cellules transformées,
  - génération des plantes transformées à partir de ces cellules, exprimant une MIPP végétale à activité phytasique codée par ladite séquence d'acide nucléique.
20. Plante transformée susceptible d'être obtenue par le procédé de la revendication 17.
21. Partie d'une plante, notamment semence, caractérisée en ce qu'elle provient d'une plante transformée selon la revendication 20.
22. Produit, notamment farine, susceptible d'être obtenu à partir d'une plante transformée selon la revendication 20 ou d'une partie d'une plante transformée selon la revendication 21.
23. Méthode de production de protéine MIPP végétale, caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes de :
  - a) transformation d'une cellule, en particulier d'un végétal ou d'un microorganisme, avec une cassette d'expression selon l'une des revendications 9 à 16,

b) éventuellement culture de ladite cellule hôte ou, dans le cas où cette cellule hôte est une cellule végétale, croissance de la plante transformée,

c) extraction de la protéine MIPP de la culture cellulaire ou de la plante transformée.

24. Utilisation d'une plante ou partie d'une plante selon les revendications 20 ou 21, ou  
5 encore d'un produit selon la revendication 22, dans toute situation dans laquelle l'activité  
phytasique est nécessaire ou désirée.
25. Utilisation selon la revendication 24, pour libérer le phosphate inorganique et/ou  
améliorer la disponibilité des cations chélatés par la phytine tels que le fer, le calcium, le  
magnésium ou le zinc.
- 10 26. Utilisation d'une cassette d'expression selon l'une des revendications 9 à 16 pour  
l'obtention de plante transgénique productrice de graines contenant une MIPP.

1/9

```

OSMIPP      1      ATGGCTGCTCCCCGCACGCCTCTC      24
ZMMIPP      1      ATGGGCATGGCTGCTCCGGCGCGCGCTGCCTCTCCCCCAACTGCTGCTCTCCTCGTTGCCGCGCTCCTCGCCG      79
                *** * *** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      25      CCCCTCGTCCCTCC-----TCGTCTCCGCCCGCGTTTCGACGTCCGCCGCCACCTCTCCACCGTCACCAGGTACGATGTG      99
ZMMIPP      80      CCGCTCGCTCCCTAGGGCGGCCACGAGTTCGATGTCCGCCGCCACCTCTCCACCGTCACCAGGTATGATGTG      159
                ** **** * *** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      100     GCGAGGGGATCCAAATAGTGTGTCTCCCTCCGCCCGCGTCTATGTCTGGATGAGTGCCCGCGTGATCCACCTCAATCTCGTGGCAAG      179
ZMMIPP      160     GCCAGGGAGTCCAGTAGTGTCTCATCTCCATGCCGTCAATCCACAGACGGGTGCCGTGTCAATTCACCTCAATTAGTGGCAAG      239
                ** **** * *** * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      180     ACATGGGACTCGGGCACCTACCAAAAAGAGAAATCAAAGAGCTGGATAGACTGGCGGTTCCGGTTGAAGGCTCTTATCGATG      259
ZMMIPP      240     ACATGGGACTCGCGCTCTACCAAGAAGCGCATCAAGGAGCTGGATAGATTGGCAGTTCGACTGGAAAGCCCTTCTGAAAG      319
                ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      260     AAGCAAAACAAGGGCCGAAAGTGACTCCCTGAAAAAAATTCCTTCATGGATGAAAGGGTGGGAGTCAACCCCTGGAAAGGT      339
ZMMIPP      320     AGGCGAATCAGGTCCTTGATAGTGATTCTCTGAAGAAATTCATCTCGGATTAAGGCTGGGAATCACGCTGGAAGGGT      399
                * ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      340     AGGTGAAAGGTGGTGAGCTGGTCAGTGAAGGGGAGGAAGAGCTATACAACCTTGCTATCAGAGTCAAGGAGAGGTTTCA      419
ZMMIPP      400     AGGACTAAAGGTGGTGAGCTGATTAGTGAAGGGGAAAGAGGAGCTTTACAATTTAGCTACCAGAATGAGGGGAGAGGTTTCA      479
                *** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
OSMIPP      420     AGGCCTATTGATGAGGAATATCACCCCTGATGTGTATTCAATAAGAGCAACTCAGGTTCCCTCGGGCATCAGCTAGTGCAG      499
ZMMIPP      480     AGATCTATTGATGACGAATATCACCCCTGATGTATATTCAATAAGAGCAACCCAGGTTCCCTCGAGCATCAGCTAGTGCAG      559
                ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG.1 (DEBUT)

OSMIPP 500 TAGCATTTGGTCTACTTTCTGGAAAGGAAGCTTGGACCTGTGAAAAACCGTGCCCTTTTCTGTCTGAGTGAG 579

ZMMIPP 560 TGGCATTTGGGTGGGACTACTTTCTGGGAAAGGAAAGCTTGGACAAGGGAAGAACCGAGCCCTTTTCTGTCTGAGTGAG 639

OSMIPP 580 AGTCGTGCAAGTGATATTGTCTGCGATTCTTTGATAGCTGTGAAACATACAAGGACTACAGGAAAAAGAGGAGCCTGA 659

ZMMIPP 640 AGTCGTGCAAGTGATATTGTCTGAGATTCTTTGACAGCTGTGAGACATACAAGGCATACAAGGAAAAAGGAGGAGCCTGA 719

OSMIPP 660 TGTGAAAAGCAAAAGGAACCAATTTTGAACACAGTCACATCGGCATTAGTTAACCGTTATCATCTCAATTTTACACCAA 739

ZMMIPP 720 TGTAGAGAAGCAAAAGGAACCAATTTAGAGCATGTCAAGCTGCACTTGTCAATCGTTATCACCTAAAAATTTACAACCTC 799

OSMIPP 740 AAGATGTTTCTTCCCTCTGGTTCCTTTGCAAGCAGGAAGCATCTTTAATGAATATAACCAATCAAGCTTGTCAACTTTT 819

ZMMIPP 800 GCGATGTTTCTTCCCTCTGGTTCCTTTGTAAGCAGGAACATCTTTGTTGAATACAACAAATCAAGCTTGTGGGCTTTT 879

OSMIPP 820 AATGAAGCTGAGGTTTATTTTCTAGAGTGGACAGATGATCTGGAGGGCTTTGTGCTAAAAGGTTATGGTGAGTCAATAAA 899

ZMMIPP 880 AATGAAGCTGAGGTTTCGTTTCTGGAGTGGACAGATGATTGGAGGGTTTGTTCATAAAGGCTATGGTGAGTCAATTAA 959

OSMIPP 900 CTATCGGATGGGACTGCCATTGCTCAAGGACGTTGTCCAGTCAATGGAAGAAGCAATCGTTGCTAAAGAAGAAAACCCACC 979

ZMMIPP 960 CTACAGGATGGGACTGCCATTGCTCAAGGATGTTGTCCAGTCAATGGAAGAAGCAATCATAGTAGAGAAGAAAACCGTG 1039

OSMIPP 980 CTGATGGTACATATGAGAAGGCAAGGCTCCGATTGTCACATGCTGAAACTGTTGTCCCTTTCTCATGTCTTCTTGGTCTT 1059

ZMMIPP 1040 CTGATGGTACGTTTGAAGGCAAGGCTCCGATTGTCACATGTCAGAAACTGTTGTTCCTTTTAGCTGCCTTCTTGGTCTT 1119

FIG. 1(SUITE)

OSMIPP 1060 TTTCCTGAAGGATCAGATTTCGCCAAGATACAAACGGGAGGAATCATTTGGACATACTCTGTGCCACCACAGGGAAGAAA 1139

ZMMIPP 1120 TTTCCTGAAGGTCAGAAAATGAGAAGATACAGAGAGAGGAAGCAATTGGACCTACCCCTTTGCCGCCACAGGGAAGAAA 1199

\*\*\*\*\* \*

OSMIPP 1140 TTGGAAGGCAGTGTGTTGTCACCTTTTGCTGGTAACAATATGTTGGCTTTGTACCACTGCCCGAGAAAAACT---GATG 1219

ZMMIPP 1200 CTGGAAGGCAGTGTGTTGGCCCTTTCGCTGGTAACAATATGCTGGTTTTATATCAATGTCCAAGCAAAAATTTCCGATG 1279

\*\*\*\*\* \*

OSMIPP 1220 GTGGTAAGATTTCCTCGGATCAGAAAGAGCTCATACTTCGTGCAGGTTATACACAATGAAGCTCCAGTTTCAATGCCGGGA 1299

ZMMIPP 1280 GCAGCACAACTCTGGAGGCCGAAACAACCTTACTTAGTTCAAGTTCTACACAACGAAGTCCCAGTTTCAATGCCCTGGG 1359

\* \*

OSMIPP 1300 TGCGGGAACAAAGATTCTGCCCATTTGAAGAGTTCAAGGAGAAAGATAGTTGAACCCACCTGAAGCATGACTACGACGC 1379

ZMMIPP 1360 TGCGGCAACAAAGATTCTGTCCGTTTCGAGGAGTTCAAGGAGAAAATTGTGAACCCGACCTGAAGCAGCAGCTACAACAT 1439

\*\*\*\*\* \*

OSMIPP 1380 CCTATGCAAGATAAG--CCGGTGGCAAGAGAGAGCCCTTCCTCCTTCAGTTCAGGATGTCCAATTTCTTCCTAGGTT 1459

ZMMIPP 1440 GATATGCAAGGTCAAATCCCCAGCGGCAAGCGAGGAGCCCTGCCTCGTTCCCTCCAGGGTGTCCAGTTTCTTCCTAGGAC 1519

\*\*\*\*\* \*

OSMIPP 1420 TGTTCGCGAGAAAGGATACCG--TGTTAGTCTCAGGATGTGAAGTCGGAGCTGTAG 1506 pb

ZMMIPP 1520 TCCTCTCGCAGAAAGGGTACCGCGGTGTGGGCGCCGAGGGCGGTCAAGACCCGAGCTGTAG 1572 pb

Légende :

\* : nucléotides identiques

ATG : codon initiateur de la traduction

FIG. 1(FIN)

```

1  MAAPRTPLPLVLLVS-----AAFDRRHLSVTTRYDVARGNSVSSAPMSDECRVIHLNLVARHGTRAPTCK 69
1  MGMAAPRAPLPLPQLLLLLVAALLAAARLPRAARADEFDVRRLHLSVTTRYDVARESSSVISMPSIPDGRCRVIHLNLVARHGTRAPTCK 88
    ***** **
    ***** * * * * *
70 RIKELDR LAVRLKALIDEAKQPESDSLKIPSWMKGWESPWKGRVKGGELVSEGEELYLNLAIRVKERFQGLFDEYHPDVYSIRATQV 159
89 RIKELDR LAVRLEALLKEANQVLDSLSLKIPSWIKGWESRWKGRTKGGELISEGEELYLNLATRMRERFQDLFDDEYHPDVYSIRATQV 178
    ***** ** * ***** * . ***** * . ***** * . ***** * . *****
160 PRASASAVAFGLGLLSGKGKLGPKVNRAF SVLSES RASDICLRFFDSCETYKYDKRKKEPDVEKQKEPILEHVTSALVNRYHLNFTPKDV 249
179 PRASASAVAFGLGLLSGKGKLGQGKNRAF SVLSES RASDICLRFFDSCETYKAYRKKEPDVEKQKEPILEHVTAALVNRYHLKFTRDRV 268
    ***** ** * ***** * . ***** * . ***** * . ***** * . *****

```

419

FIG. 2 (DEBUT)

5/9

```

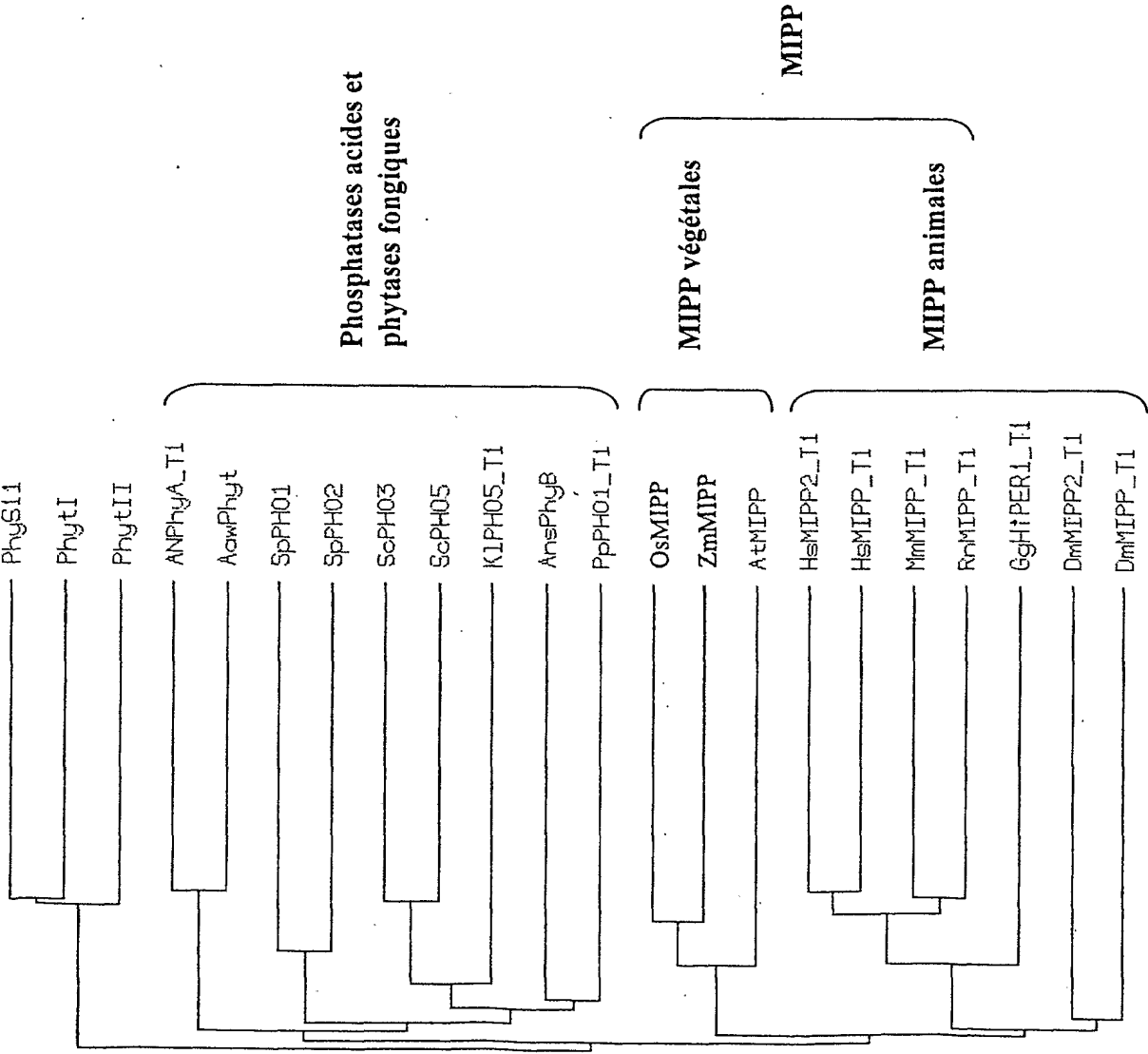
250 SSLWFLCKQAEASLMNITNQACQLFNEAEVYFLEWTDDEGLKGYGESINYRMGLPLLKDVVQSMEEAIIVAKEENHPDGTYEKARLRFA 339
269 SSLWFLCKQETSLLNTTNQACGLFNEAEVRFEWTDDEGLKGYGESINYRMGLPLLKDVVQSMEEAI IAREENRADGTFEKARLRFA 358
***** * *****
340 HAETVVPFSCLLGLEGSDFAKIQREESLDIPPVPPQGRNWKGSVVPFAGNNMLALYQCPGKT-DGGKISRDKQSSYFVQVIHNEAPV 428
359 HAETVVPFSCLLGLEGPEIEKIQREEALDLPPLPPQGRNWKGSVVPFAGNNMLVLYQCPSKISDSTISGGRNNSYLVQVLHNEVPV 448
***** * *****
429 SMPGCGNKDFCPEEFKEKIVEPHLKHHDYDALCKIRPVAREEP-SSFSSRMSNEFFLGFSQKGYR-VSAQDVKSEL 502 acides aminés
449 SMPGCGNKDFCPEEFKEKIVKPHLKHHDYNMICKVKSPAASEEPASFASRVSSFFLGLLSQKGYRGVGAEGVKTEL 524 acides aminés
***** * *****

```

\* : acides aminés identiques

FIG. 2(FIN)





**FIG.3**

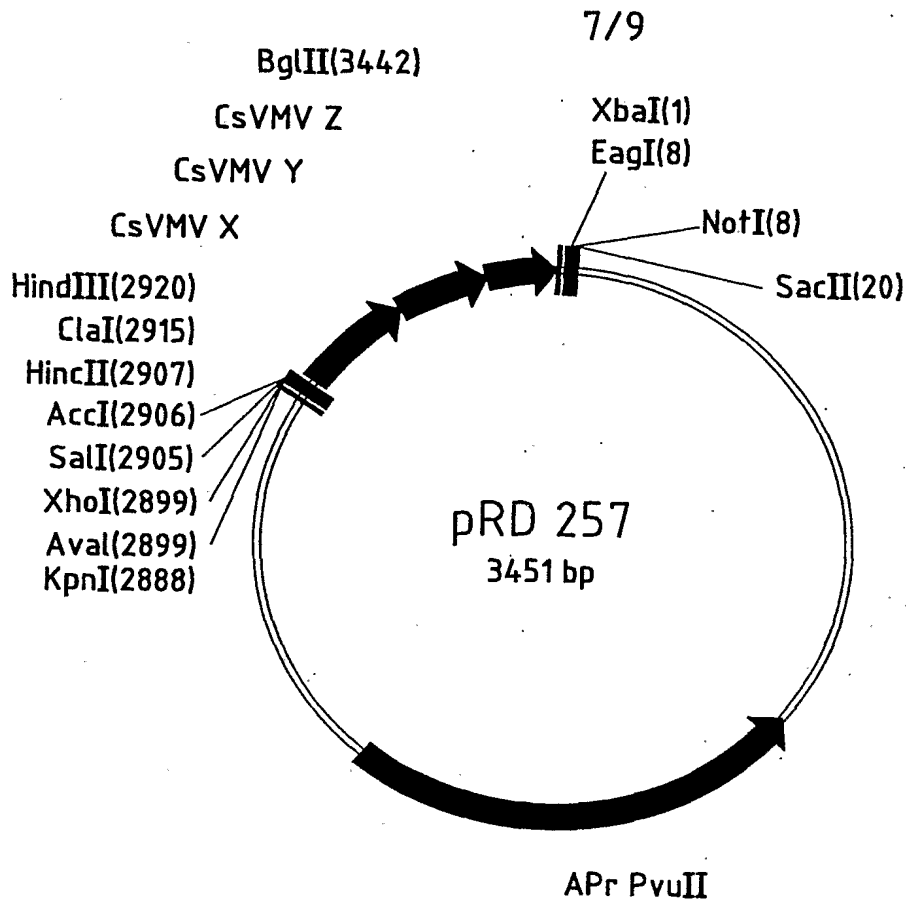


FIG.4

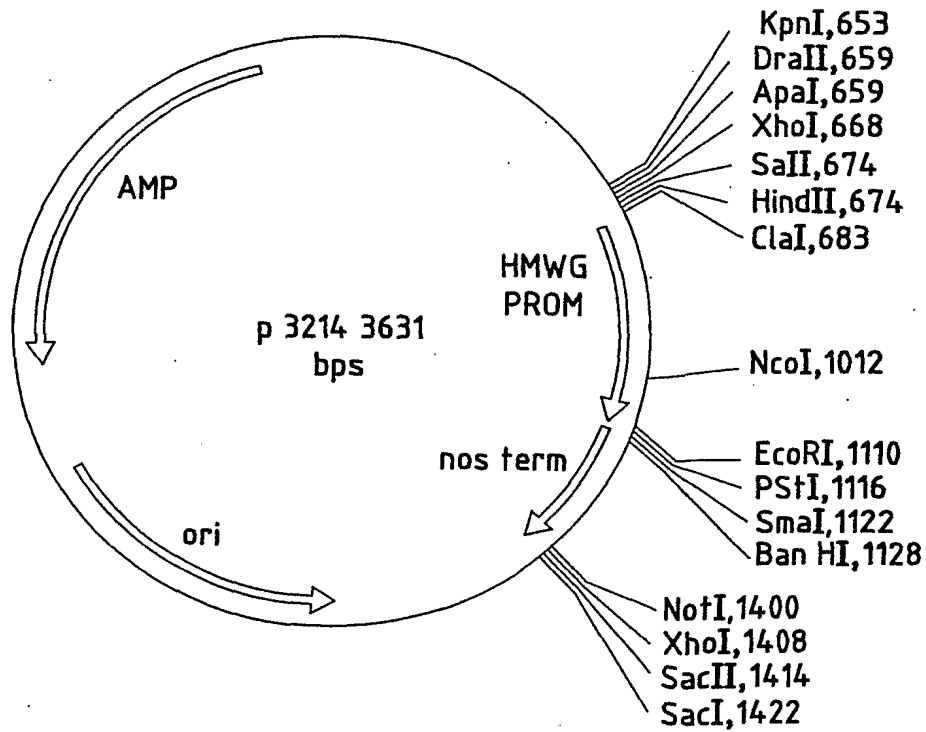
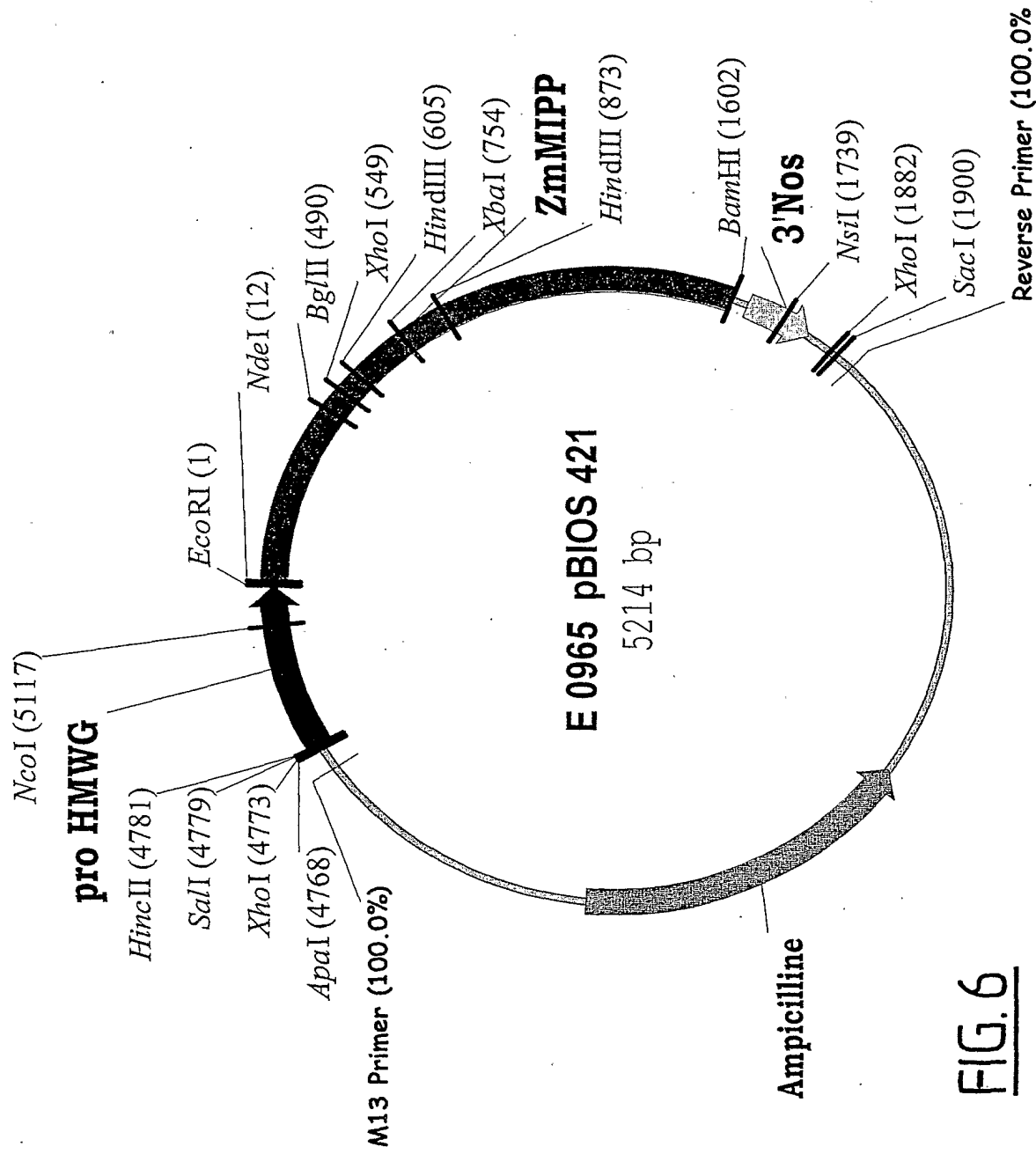
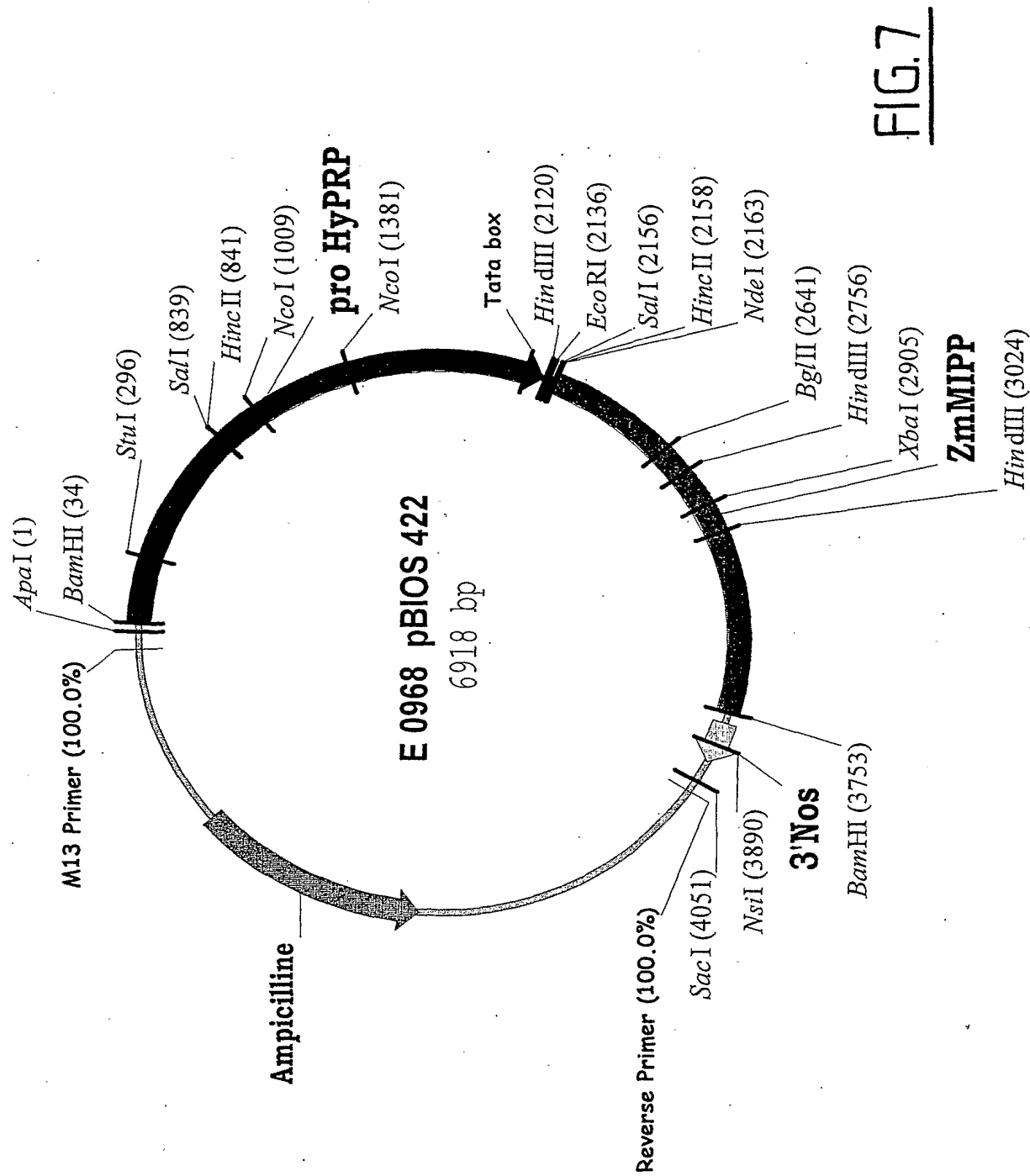


FIG.5



**FIG. 6**



**FIG. 7**

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; BIOGEMMA

&lt;120&gt; Acide nucléique codant pour une phosphatase végétale de type MIPP à activité phytasique, et applications

&lt;130&gt; BET 01/0621

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1575

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (1575)

&lt;400&gt; 1

atg ggc atg gct gct ccg cgc gcg ccg ctg cct ctc ccc caa ctg ctg	48
Met Gly Met Ala Ala Pro Arg Ala Pro Leu Pro Leu Pro Gln Leu Leu	
1 5 10 15	
ctc ctc ctc gtt gcc gcg ctc ctc gcc gcc gct cgc ctc cct agg gcg	96
Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Arg Leu Pro Arg Ala	
20 25 30	
gcc agg gcg gac gag ttc gat gtc cgc cgc cac ctc tcc acc gtc acc	144
Ala Arg Ala Asp Glu Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr	
35 40 45	
agg tat gat gtg gcc agg gag tcc agt agt gtc atc tcc atg ccg tca	192
Arg Tyr Asp Val Ala Arg Glu Ser Ser Ser Val Ile Ser Met Pro Ser	
50 55 60	
atc cca gac ggg tgc cgt gtc att cac ctc aat tta gtg gca aga cat	240
Ile Pro Asp Gly Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His	
65 70 75 80	
ggg act cgc gct cct acc aag aag cgc atc aag gag ctg gat aga ttg	288
Gly Thr Arg Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu	
85 90 95	
gca gtt cga ctg gaa gcc ctt ctg aaa gag gcg aat cag gtc ctt gat	336
Ala Val Arg Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Asn Gln Val Leu Asp	
100 105 110	
agt gat tct ctg aag aaa att cca tcc tgg att aaa ggc tgg gaa tca	384
Ser Asp Ser Leu Lys Lys Ile Pro Ser Trp Ile Lys Gly Trp Glu Ser	
115 120 125	
cgc tgg aag ggt agg act aaa ggt ggt gag ctg att agt gaa ggg gaa	432
Arg Trp Lys Gly Arg Thr Lys Gly Gly Glu Leu Ile Ser Glu Gly Glu	
130 135 140	

gag gag ctt tac aat tta gct acc aga atg agg gag agg ttt caa gat	480
Glu Glu Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Met Arg Glu Arg Phe Gln Asp	
145 150 155 160	
cta ttt gat gac gaa tat cac cct gat gta tat tca ata aga gca acc	528
Leu Phe Asp Asp Glu Tyr His Pro Asp Val Tyr Ser Ile Arg Ala Thr	
165 170 175	
cag gtt cct cga gca tca gct agt gca gtg gca ttt ggg ttg gga cta	576
Gln Val Pro Arg Ala Ser Ala Ser Ala Val Ala Phe Gly Leu Gly Leu	
180 185 190	
ctt tct ggg aaa gga aag ctt gga caa ggg aag aac cga gcc ttt tct	624
Leu Ser Gly Lys Gly Lys Leu Gly Gln Gly Lys Asn Arg Ala Phe Ser	
195 200 205	
gtt ctg agt gag agt cgt gca agt gat att tgt ctg aga ttc ttt gac	672
Val Leu Ser Glu Ser Arg Ala Ser Asp Ile Cys Leu Arg Phe Phe Asp	
210 215 220	
agc tgt gag aca tac aag gca tac agg aaa agg aag gag cct gat gta	720
Ser Cys Glu Thr Tyr Lys Ala Tyr Arg Lys Arg Lys Glu Pro Asp Val	
225 230 235 240	
gag aag caa aag gaa cca att cta gag cat gtc aca gct gca ctt gtc	768
Glu Lys Gln Lys Glu Pro Ile Leu Glu His Val Thr Ala Ala Leu Val	
245 250 255	
aat cgt tat cac cta aaa ttt aca act cgc gat gtt tct tcc ctc tgg	816
Asn Arg Tyr His Leu Lys Phe Thr Thr Arg Asp Val Ser Ser Leu Trp	
260 265 270	
ttt ctt tgt aag cag gaa aca tct ttg ttg aat aca aca aat caa gct	864
Phe Leu Cys Lys Gln Glu Thr Ser Leu Leu Asn Thr Thr Asn Gln Ala	
275 280 285	
tgt ggg ctt ttt aat gaa gct gag gtt cgt ttt ctg gag tgg aca gat	912
Cys Gly Leu Phe Asn Glu Ala Glu Val Arg Phe Leu Glu Trp Thr Asp	
290 295 300	
gat ttg gag ggt ttt gtt cta aaa ggc tat ggt gag tca att aac tac	960
Asp Leu Glu Gly Phe Val Leu Lys Gly Tyr Gly Glu Ser Ile Asn Tyr	
305 310 315 320	
agg atg gga ctg cca ttg ctc aag gat gtt gtc cag tca atg gaa gaa	1008
Arg Met Gly Leu Pro Leu Leu Lys Asp Val Val Gln Ser Met Glu Glu	
325 330 335	
gca atc ata gct aga gaa gaa aac cgt gct gat ggt acg ttt gaa aag	1056
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Glu Asn Arg Ala Asp Gly Thr Phe Glu Lys	
340 345 350	
gca agg ctc cga ttt gca cat gca gaa act gtt gtt cct ttt agc tgc	1104
Ala Arg Leu Arg Phe Ala His Ala Glu Thr Val Val Pro Phe Ser Cys	
355 360 365	
ctt ctt ggt ctt ttt ctt gaa ggt cca gaa att gag aag ata cag aga	1152
Leu Leu Gly Leu Phe Leu Glu Gly Pro Glu Ile Glu Lys Ile Gln Arg	
370 375 380	

gag gaa gca ttg gac cta ccc cct ttg ccg cca cag gga aga aac tgg 1200  
 Glu Glu Ala Leu Asp Leu Pro Pro Leu Pro Pro Gln Gly Arg Asn Trp  
 385 390 395 400

aag ggc agt gtt gtt gcg cct ttc gct ggt aac aat atg ctg gtt tta 1248  
 Lys Gly Ser Val Val Ala Pro Phe Ala Gly Asn Asn Met Leu Val Leu  
 405 410 415

tat caa tgt cca agc aaa att tcg gat ggc agc aca atc tct gga ggc 1296  
 Tyr Gln Cys Pro Ser Lys Ile Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Gly Gly  
 420 425 430

cga aac aac tct tac tta gtt caa gtt cta cac aac gaa gtc cca gtt 1344  
 Arg Asn Asn Ser Tyr Leu Val Gln Val Leu His Asn Glu Val Pro Val  
 435 440 445

tca atg cct ggg tgc ggc aac aaa gat ttc tgt ccg ttc gag gag ttc 1392  
 Ser Met Pro Gly Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe  
 450 455 460

aag gag aaa att gtg aaa ccg cac ctg aag cac gac tac aac atg ata 1440  
 Lys Glu Lys Ile Val Lys Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asn Met Ile  
 465 470 475 480

tgc aag gtc aaa tcc cca gcg gca agc gag gag cct gcc tcg ttc gcc 1488  
 Cys Lys Val Lys Ser Pro Ala Ala Ser Glu Glu Pro Ala Ser Phe Ala  
 485 490 495

tcc agg gtg tcc agt ttc ttc cta gga ctc ctc tcg cag aaa ggg tac 1536  
 Ser Arg Val Ser Ser Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ser Gln Lys Gly Tyr  
 500 505 510

cgc ggt gtg ggc gcc gag ggc gtc aag acc gag ctg tag 1575  
 Arg Gly Val Gly Ala Glu Gly Val Lys Thr Glu Leu  
 515 520 525

<210> 2

<211> 524

<212> PRT

<213> Zea mays

<400> 2

Met Gly Met Ala Ala Pro Arg Ala Pro Leu Pro Leu Pro Gln Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Arg Leu Pro Arg Ala  
 20 25 30

Ala Arg Ala Asp Glu Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr  
 35 40 45

Arg Tyr Asp Val Ala Arg Glu Ser Ser Ser Val Ile Ser Met Pro Ser  
 50 55 60

Ile Pro Asp Gly Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His  
 65 70 75 80

Gly Thr Arg Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu  
 85 90 95

Ala	Val	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Lys	Glu	Ala	Asn	Gln	Val	Leu	Asp	100	105	110
Ser	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Ile	Pro	Ser	Trp	Ile	Lys	Gly	Trp	Glu	Ser	115	120	125
Arg	Trp	Lys	Gly	Arg	Thr	Lys	Gly	Gly	Glu	Leu	Ile	Ser	Glu	Gly	Glu	130	135	140
Glu	Glu	Leu	Tyr	Asn	Leu	Ala	Thr	Arg	Met	Arg	Glu	Arg	Phe	Gln	Asp	145	150	155
Leu	Phe	Asp	Asp	Glu	Tyr	His	Pro	Asp	Val	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ala	Thr	165	170	175
Gln	Val	Pro	Arg	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Leu	180	185	190
Leu	Ser	Gly	Lys	Gly	Lys	Leu	Gly	Gln	Gly	Lys	Asn	Arg	Ala	Phe	Ser	195	200	205
Val	Leu	Ser	Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	Cys	Leu	Arg	Phe	Phe	Asp	210	215	220
Ser	Cys	Glu	Thr	Tyr	Lys	Ala	Tyr	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Pro	Asp	Val	225	230	235
Glu	Lys	Gln	Lys	Glu	Pro	Ile	Leu	Glu	His	Val	Thr	Ala	Ala	Leu	Val	245	250	255
Asn	Arg	Tyr	His	Leu	Lys	Phe	Thr	Thr	Arg	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Trp	260	265	270
Phe	Leu	Cys	Lys	Gln	Glu	Thr	Ser	Leu	Leu	Asn	Thr	Thr	Asn	Gln	Ala	275	280	285
Cys	Gly	Leu	Phe	Asn	Glu	Ala	Glu	Val	Arg	Phe	Leu	Glu	Trp	Thr	Asp	290	295	300
Asp	Leu	Glu	Gly	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Glu	Ser	Ile	Asn	Tyr	305	310	315
Arg	Met	Gly	Leu	Pro	Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Val	Gln	Ser	Met	Glu	Glu	325	330	335
Ala	Ile	Ile	Ala	Arg	Glu	Glu	Asn	Arg	Ala	Asp	Gly	Thr	Phe	Glu	Lys	340	345	350
Ala	Arg	Leu	Arg	Phe	Ala	His	Ala	Glu	Thr	Val	Val	Pro	Phe	Ser	Cys	355	360	365
Leu	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Glu	Gly	Pro	Glu	Ile	Glu	Lys	Ile	Gln	Arg	370	375	380
Glu	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Asn	Trp	385	390	395
Lys	Gly	Ser	Val	Val	Ala	Pro	Phe	Ala	Gly	Asn	Asn	Met	Leu	Val	Leu	405	410	415
Tyr	Gln	Cys	Pro	Ser	Lys	Ile	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly			



420	425	430
Arg Asn Asn Ser Tyr Leu Val Gln Val Leu His Asn Glu Val Pro Val		
435	440	445
Ser Met Pro Gly Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe		
450	455	460
Lys Glu Lys Ile Val Lys Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asn Met Ile		
465	470	475
Cys Lys Val Lys Ser Pro Ala Ala Ser Glu Glu Pro Ala Ser Phe Ala		
485	490	495
Ser Arg Val Ser Ser Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ser Gln Lys Gly Tyr		
500	505	510
Arg Gly Val Gly Ala Glu Gly Val Lys Thr Glu Leu		
515	520	

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1509

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; riz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1509)

&lt;400&gt; 3

atg gct gct ccc cgc acg cct ctc ccc ctc gtc ctc ctc ctc gtc tcc	48
Met Ala Ala Pro Arg Thr Pro Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu Val Ser	
1 5 10 15	
gcc gcg ttc gac gtc cgc cgc cac ctc tcc acc gtc acc agg tac gat	96
Ala Ala Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr Arg Tyr Asp	
20 25 30	
gtg gcg agg gga tcc aat agt gtg tcc tcc gcg ccg tct atg tcg gat	144
Val Ala Arg Gly Ser Asn Ser Val Ser Ser Ala Pro Ser Met Ser Asp	
35 40 45	
gag tgc cgc gtg atc cac ctc aat ctc gtg gca aga cat ggg act cgc	192
Glu Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His Gly Thr Arg	
50 55 60	
gca cct acc aaa aag aga atc aaa gag ctg gat aga ctg gcg gtt cgg	240
Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu Ala Val Arg	
65 70 75 80	
ttg aag gct ctt atc gat gaa gca aaa caa ggg cct gaa agt gac tcc	288
Leu Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ala Lys Gln Gly Pro Glu Ser Asp Ser	
85 90 95	
ctg aaa aaa att cct tca tgg atg aaa ggg tgg gag tca ccc tgg aaa	336
Leu Lys Lys Ile Pro Ser Trp Met Lys Gly Trp Glu Ser Pro Trp Lys	
100 105 110	
ggg agg gtg aaa ggt ggt gag ctg gtc agt gaa ggg gag gaa gag cta	384

Gly	Arg	Val	Lys	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu	
		115					120					125				
tac	aac	ctt	gct	atc	aga	gtc	aag	gag	agg	ttt	caa	ggc	cta	ttt	gat	432
Tyr	Asn	Leu	Ala	Ile	Arg	Val	Lys	Glu	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp	
	130					135					140					
gag	gaa	tat	cac	cct	gat	gtg	tat	tca	ata	aga	gca	act	cag	gtt	cct	480
Glu	Glu	Tyr	His	Pro	Asp	Val	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ala	Thr	Gln	Val	Pro	
145				150						155					160	
cgg	gca	tca	gct	agt	gca	gta	gca	ttt	ggg	ttg	ggg	cta	ctt	tct	ggg	528
Arg	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	
			165						170					175		
aaa	ggg	aag	ctt	gga	cct	gtg	aaa	aac	cgt	gcc	ttt	tct	gtt	ctg	agt	576
Lys	Gly	Lys	Leu	Gly	Pro	Val	Lys	Asn	Arg	Ala	Phe	Ser	Val	Leu	Ser	
		180						185					190			
gag	agt	cgt	gca	agt	gat	att	tgt	ctg	cga	ttc	ttt	gat	agc	tgt	gaa	624
Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	Cys	Leu	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Cys	Glu	
	195					200						205				
aca	tac	aag	gac	tac	agg	aaa	aga	aag	gag	cct	gat	gtt	gaa	aag	caa	672
Thr	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Pro	Asp	Val	Glu	Lys	Gln	
	210					215					220					
aag	gaa	cca	att	tta	gaa	cac	gtc	aca	tcg	gca	tta	gtt	aac	cgt	tat	720
Lys	Glu	Pro	Ile	Leu	Glu	His	Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Asn	Arg	Tyr	
225				230						235					240	
cat	ctc	aat	ttt	aca	cca	aaa	gat	gtt	tct	tcc	ctc	tgg	ttc	ctt	tgc	768
His	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Lys	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Trp	Phe	Leu	Cys	
				245					250					255		
aag	cag	gaa	gca	tct	tta	atg	aat	ata	acc	aat	caa	gct	tgt	caa	ctt	816
Lys	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Met	Asn	Ile	Thr	Asn	Gln	Ala	Cys	Gln	Leu	
			260					265					270			
ttt	aat	gaa	gct	gag	gtt	tat	ttt	cta	gag	tgg	aca	gat	gat	ctg	gag	864
Phe	Asn	Glu	Ala	Glu	Val	Tyr	Phe	Leu	Glu	Trp	Thr	Asp	Asp	Leu	Glu	
	275					280						285				
ggc	ttt	gtg	cta	aaa	ggg	tat	ggg	gag	tca	ata	aac	tat	cgg	atg	gga	912
Gly	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Glu	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Met	Gly	
	290				295						300					
ctg	cca	ttg	ctc	aag	gac	gtt	gtc	cag	tca	atg	gaa	gaa	gca	atc	gtt	960
Leu	Pro	Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Val	Gln	Ser	Met	Glu	Glu	Ala	Ile	Val	
305				310						315					320	
gct	aaa	gaa	gaa	aac	cac	cct	gat	ggg	aca	tat	gag	aag	gca	agg	ctc	1008
Ala	Lys	Glu	Glu	Asn	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Glu	Lys	Ala	Arg	Leu	
				325					330				335			
cga	ttt	gca	cat	gct	gaa	act	gtt	gtc	cct	ttc	tca	tgt	ctt	ctt	ggg	1056
Arg	Phe	Ala	His	Ala	Glu	Thr	Val	Val	Pro	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Gly	
			340					345					350			
ctt	ttt	ctt	gaa	gga	tca	gat	ttt	gcg	aag	ata	caa	cgg	gag	gaa	tca	1104
Leu	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Ala	Lys	Ile	Gln	Arg	Glu	Glu	Ser	

355	360	365	
ttg gac ata cct cct gtg cca cca cag gga aga aat tgg aag ggc agt			1152
Leu Asp Ile Pro Pro Val Pro Pro Gln Gly Arg Asn Trp Lys Gly Ser			
370	375	380	
gtt gtt gca cct ttt gct ggt aac aat atg ttg gct ttg tac cag tgc			1200
Val Val Ala Pro Phe Ala Gly Asn Asn Met Leu Ala Leu Tyr Gln Cys			
385	390	395	400
cca gga aaa act gat ggt ggt aag att tct cgg gat cag aag agc tca			1248
Pro Gly Lys Thr Asp Gly Gly Lys Ile Ser Arg Asp Gln Lys Ser Ser			
405	410	415	
tac ttc gtg cag gtt ata cac aat gaa gct cca gtt tca atg ccg gga			1296
Tyr Phe Val Gln Val Ile His Asn Glu Ala Pro Val Ser Met Pro Gly			
420	425	430	
tgc ggg aac aaa gat ttc tgc cca ttt gaa gag ttc aag gag aag ata			1344
Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe Lys Glu Lys Ile			
435	440	445	
gtt gaa ccc cac ctg aag cat gac tac gac gcc cta tgc aag ata agg			1392
Val Glu Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asp Ala Leu Cys Lys Ile Arg			
450	455	460	
ccg gtg gca aga gag gag cct tcc tcc ttc agt tcc agg atg tcc aat			1440
Pro Val Ala Arg Glu Glu Pro Ser Ser Phe Ser Ser Arg Met Ser Asn			
465	470	475	480
ttc ttc cta ggt ttg ttc tcg cag aaa gga tac cgt gtt agt gct cag			1488
Phe Phe Leu Gly Leu Phe Ser Gln Lys Gly Tyr Arg Val Ser Ala Gln			
485	490	495	
gat gtg aag tcg gag ctg tag			1509
Asp Val Lys Ser Glu Leu			
500			

<210> 4  
 <211> 502  
 <212> PRT  
 <213> riz

<400> 4  
 Met Ala Ala Pro Arg Thr Pro Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu Val Ser  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr Arg Tyr Asp  
 20 25 30  
 Val Ala Arg Gly Ser Asn Ser Val Ser Ser Ala Pro Ser Met Ser Asp  
 35 40 45  
 Glu Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His Gly Thr Arg  
 50 55 60  
 Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu Ala Val Arg  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ala Lys Gln Gly Pro Glu Ser Asp Ser

85										90					95				
Leu	Lys	Lys	Ile	Pro	Ser	Trp	Met	Lys	Gly	Trp	Glu	Ser	Pro	Trp	Lys				
			100						105					110					
Gly	Arg	Val	Lys	Gly	Gly	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Glu	Glu	Glu	Leu				
		115					120					125							
Tyr	Asn	Leu	Ala	Ile	Arg	Val	Lys	Glu	Arg	Phe	Gln	Gly	Leu	Phe	Asp				
	130					135					140								
Glu	Glu	Tyr	His	Pro	Asp	Val	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ala	Thr	Gln	Val	Pro				
145					150					155					160				
Arg	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	Ala	Phe	Gly	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly				
				165					170					175					
Lys	Gly	Lys	Leu	Gly	Pro	Val	Lys	Asn	Arg	Ala	Phe	Ser	Val	Leu	Ser				
			180					185					190						
Glu	Ser	Arg	Ala	Ser	Asp	Ile	Cys	Leu	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Cys	Glu				
		195					200					205							
Thr	Tyr	Lys	Asp	Tyr	Arg	Lys	Arg	Lys	Glu	Pro	Asp	Val	Glu	Lys	Gln				
	210					215					220								
Lys	Glu	Pro	Ile	Leu	Glu	His	Val	Thr	Ser	Ala	Leu	Val	Asn	Arg	Tyr				
225					230					235					240				
His	Leu	Asn	Phe	Thr	Pro	Lys	Asp	Val	Ser	Ser	Leu	Trp	Phe	Leu	Cys				
				245					250					255					
Lys	Gln	Glu	Ala	Ser	Leu	Met	Asn	Ile	Thr	Asn	Gln	Ala	Cys	Gln	Leu				
			260					265					270						
Phe	Asn	Glu	Ala	Glu	Val	Tyr	Phe	Leu	Glu	Trp	Thr	Asp	Asp	Leu	Glu				
		275					280					285							
Gly	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Tyr	Gly	Glu	Ser	Ile	Asn	Tyr	Arg	Met	Gly				
	290					295					300								
Leu	Pro	Leu	Leu	Lys	Asp	Val	Val	Gln	Ser	Met	Glu	Glu	Ala	Ile	Val				
305				310						315					320				
Ala	Lys	Glu	Glu	Asn	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Glu	Lys	Ala	Arg	Leu				
				325					330					335					
Arg	Phe	Ala	His	Ala	Glu	Thr	Val	Val	Pro	Phe	Ser	Cys	Leu	Leu	Gly				
			340					345					350						
Leu	Phe	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Phe	Ala	Lys	Ile	Gln	Arg	Glu	Glu	Ser				
	355						360				365								
Leu	Asp	Ile	Pro	Pro	Val	Pro	Pro	Gln	Gly	Arg	Asn	Trp	Lys	Gly	Ser				
	370					375					380								
Val	Val	Ala	Pro	Phe	Ala	Gly	Asn	Asn	Met	Leu	Ala	Leu	Tyr	Gln	Cys				
385					390					395					400				
Pro	Gly	Lys	Thr	Asp	Gly	Gly	Lys	Ile	Ser	Arg	Asp	Gln	Lys	Ser	Ser				
				405					410					415					

Tyr Phe Val Gln Val Ile His Asn Glu Ala Pro Val Ser Met Pro Gly  
                   420                                  425                                  430  
 Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe Lys Glu Lys Ile  
                   435                                  440                                  445  
 Val Glu Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asp Ala Leu Cys Lys Ile Arg  
                   450                                  455                                  460  
 Pro Val Ala Arg Glu Glu Pro Ser Ser Phe Ser Ser Arg Met Ser Asn  
 465                                  470                                  475                                  480  
 Phe Phe Leu Gly Leu Phe Ser Gln Lys Gly Tyr Arg Val Ser Ala Gln  
                                   485                                  490                                  495  
 Asp Val Lys Ser Glu Leu  
                   500

<210> 5  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
           oligonucléotide

<400> 5  
 catatgggca tggctgctcc gc 22

<210> 6  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
           oligonucléotide

<400> 6  
 ggatcctagg tcttgacgcc tacagc 26

<210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
           oligonucléotide

<400> 7  
 caagacatgg gactcgcg 19

<210> 8

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 8

cgcgagtccc atgtcttgc

19

<210> 9

<211> 22

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 9

caaatcgatt cgccatggct gc

22

<210> 10

<211> 27

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 10

ggatcctaca gctccgactt cacatcc

27

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 11

catatggctg ctccccgcac g

21

<210> 12

<211> 29

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 12

ggatcctaca gctccgtctt aacatcttg

29

<210> 13

<211> 25

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
oligonucléotide

<400> 13

gtctatcgtt tctattaagc cagac

25

<210> 14

<211> 478

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence  
artificielle:Description de la séquence  
artificielle : EST

<400> 14

ggcacgagcc gggggtggca gcagaggagg agccatcctc tttcagctcc aagctcaact 60  
tcttccttga tctgctctcg cggaaagggtt accgttttaa ggggcaagat gttaagacgg 120  
agctgtagag tacaggcgcc ttgtgccgcg acgaccttgg attaggactg acatgtggac 180  
actaaccttg gtgtttttgt acctagggtt ggtgacttgt gagcgagttc agcgcgtatc 240  
aggctctgat ggcttgcaagg tgccgccgtg tgcgagctctg gcttaataga aacgatagac 300  
tactcatatt aataaggaat tcttttttctg gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ctcgagagta 360  
cttntagagc ggccgcgggc ccatcgattt tncacccggg tggggtacca ggtaagtgt 420  
cccaattcgc cctatagtga gtcgnattac aattcactgg cccgcgnttt acaacgtn 478

<210> 15

<211> 25

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide  
signal

<400> 15

Met Gly Met Ala Ala Pro Arg Ala Pro Leu Pro Leu Pro Gln Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ala  
20 25

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: peptide  
signal

<400> 16

Met Ala Ala Pro Arg Thr Pro Leu Pro Leu Val Leu Leu Leu Val Ser  
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 17

<211> 1575

<212> ADN

<213> Zea mays

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1575)

<400> 17

atg ggc atg act gcg ccg cgc gcg ccg ctg cct ctc ccc caa ctg ctg	48
Met Gly Met Thr Ala Pro Arg Ala Pro Leu Pro Leu Pro Gln Leu Leu	
1 5 10 15	
ctc ctc ctc gtt gcc gcg ctc ctc gcc gcc gct ccc ctc cct agg gcg	96
Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro Leu Pro Arg Ala	
20 25 30	
gcc agg gcg gac gag ttc gac gtc cgc cgc cac ctc tcc acc gtc acc	144
Ala Arg Ala Asp Glu Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr	
35 40 45	
agg tat gat gtg gcc agg gag tcc agt agt gtc atc tcc atg ccg tca	192
Arg Tyr Asp Val Ala Arg Glu Ser Ser Ser Val Ile Ser Met Pro Ser	
50 55 60	
atc cca gac ggg tgc cgt gtc att cac ctc aat tta gtg gca aga cat	240
Ile Pro Asp Gly Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His	
65 70 75 80	
ggg act cgc gct cct acc aag aag cgc atc aag gag ctg gat aga ttg	288
Gly Thr Arg Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu	
85 90 95	
gca gtt cga ctg gaa gcc ctt ctg aaa gag gca aat cag gtc ctt gat	336
Ala Val Arg Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Asn Gln Val Leu Asp	
100 105 110	
agt gat tct ctg aag aaa att cca tcc tgg att aaa ggc tgg gaa tca	384
Ser Asp Ser Leu Lys Lys Ile Pro Ser Trp Ile Lys Gly Trp Glu Ser	
115 120 125	
cgc tgg aag ggt agg act aaa ggt ggt gag ctg att agt gaa ggg gaa	432
Arg Trp Lys Gly Arg Thr Lys Gly Gly Glu Leu Ile Ser Glu Gly Glu	
130 135 140	
gag gag ctt tac aat tta gct acc aga atg agg gag agg ttt caa gat	480
Glu Glu Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Met Arg Glu Arg Phe Gln Asp	
145 150 155 160	



cta ttt gat gac gaa tat cac cct gat gta tat tca ata aga gca acc	528
Leu Phe Asp Asp Glu Tyr His Pro Asp Val Tyr Ser Ile Arg Ala Thr	
165 170 175	
cag gtt cct cga gca tca gct agt gca gtg gca ttt ggg ttg gga cta	576
Gln Val Pro Arg Ala Ser Ala Ser Ala Val Ala Phe Gly Leu Gly Leu	
180 185 190	
ctt tct ggg aaa gga aag ctt gga caa ggg aag aac cga gcc ttt tct	624
Leu Ser Gly Lys Gly Lys Leu Gly Gln Gly Lys Asn Arg Ala Phe Ser	
195 200 205	
gtt ctg agt gag agt cgt gca agt gat att tgt ctg aga ttc ttt gac	672
Val Leu Ser Glu Ser Arg Ala Ser Asp Ile Cys Leu Arg Phe Phe Asp	
210 215 220	
agc tgt gag aca tac aag gca tac agg aga agg aag gag cct gat gta	720
Ser Cys Glu Thr Tyr Lys Ala Tyr Arg Arg Arg Lys Glu Pro Asp Val	
225 230 235 240	
gag aag caa aag gaa cca att cta gag cat gtc aca gct gca ctt gtc	768
Glu Lys Gln Lys Glu Pro Ile Leu Glu His Val Thr Ala Ala Leu Val	
245 250 255	
aat cgt tat cac cta aaa ttt aca act cgc gat gtt tct tcc ctc tgg	816
Asn Arg Tyr His Leu Lys Phe Thr Thr Arg Asp Val Ser Ser Leu Trp	
260 265 270	
ttt ctt tgt aag cag gaa gca tct ttg ttg aat aca aca aat caa gct	864
Phe Leu Cys Lys Gln Glu Ala Ser Leu Leu Asn Thr Thr Asn Gln Ala	
275 280 285	
tgt ggg ctt ttt aat gaa gct gag gtt cgt ttt ctg gag tgg aca gat	912
Cys Gly Leu Phe Asn Glu Ala Glu Val Arg Phe Leu Glu Trp Thr Asp	
290 295 300	
gat ttg gag ggt ttt gtt cta aaa ggc tat ggt gag tca att aac tac	960
Asp Leu Glu Gly Phe Val Leu Lys Gly Tyr Gly Glu Ser Ile Asn Tyr	
305 310 315 320	
agg atg gga ctg cca ttg ctc aag gat gtt gtc cag tca atg gaa gaa	1008
Arg Met Gly Leu Pro Leu Leu Lys Asp Val Val Gln Ser Met Glu Glu	
325 330 335	
gca atc ata gct aga gaa gaa aac cgt gct gat ggt acg ttt gaa aag	1056
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Glu Asn Arg Ala Asp Gly Thr Phe Glu Lys	
340 345 350	
gca agg ctc cga ttt gca ctt gca gaa act gtt gtt cct ttt agc tgc	1104
Ala Arg Leu Arg Phe Ala Leu Ala Glu Thr Val Val Pro Phe Ser Cys	
355 360 365	
ctt ctt ggt ctt ttt ctt gaa ggt cca gaa att gag agg ata cag aga	1152
Leu Leu Gly Leu Phe Leu Glu Gly Pro Glu Ile Glu Arg Ile Gln Arg	
370 375 380	
gag gaa gca ttg gac cta ccc cct ttg ccg cca cag gga aga aac tgg	1200
Glu Glu Ala Leu Asp Leu Pro Pro Leu Pro Pro Gln Gly Arg Asn Trp	
385 390 395 400	

aag ggc agt gtt gtt gcg cct ttt gct ggt aac aat atg ctg gtt tta 1248  
Lys Gly Ser Val Val Ala Pro Phe Ala Gly Asn Asn Met Leu Val Leu  
405 410 415  
tat caa tgt cca agc aaa att tcg gat ggc agc aca atc tct gga ggc 1296  
Tyr Gln Cys Pro Ser Lys Ile Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Gly Gly  
420 425 430  
cga aac aac tct tac tta gtt caa gtt cta cac aac gaa gtc cca gtt 1344  
Arg Asn Asn Ser Tyr Leu Val Gln Val Leu His Asn Glu Val Pro Val  
435 440 445  
tca atg cct ggg tgc ggc aac aaa gat ttc tgt ccg ttc gag gag ttc 1392  
Ser Met Pro Gly Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe  
450 455 460  
aag gag aaa att gtg aaa ccg cac ctg aag cac gac tac aac atg ata 1440  
Lys Glu Lys Ile Val Lys Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asn Met Ile  
465 470 475 480  
tgc aag gtc aaa tcc cca gcg gca agc gag gag cct gcc tcg ttc gcc 1488  
Cys Lys Val Lys Ser Pro Ala Ala Ser Glu Glu Pro Ala Ser Phe Ala  
485 490 495  
tcc agg gtg tcc agt ttc ttc cta gga ctc ctc tcg cag aaa ggg tac 1536  
Ser Arg Val Ser Ser Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ser Gln Lys Gly Tyr  
500 505 510  
cgc ggt gtg ggc gcc gag ggc gtc aag acc gag ctg tag 1575  
Arg Gly Val Gly Ala Glu Gly Val Lys Thr Glu Leu  
515 520 525

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 524

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Zea mays

&lt;400&gt; 18

Met Gly Met Thr Ala Pro Arg Ala Pro Leu Pro Leu Pro Gln Leu Leu  
1 5 10 15  
Leu Leu Leu Val Ala Ala Leu Leu Ala Ala Ala Pro Leu Pro Arg Ala  
20 25 30  
Ala Arg Ala Asp Glu Phe Asp Val Arg Arg His Leu Ser Thr Val Thr  
35 40 45  
Arg Tyr Asp Val Ala Arg Glu Ser Ser Ser Val Ile Ser Met Pro Ser  
50 55 60  
Ile Pro Asp Gly Cys Arg Val Ile His Leu Asn Leu Val Ala Arg His  
65 70 75 80  
Gly Thr Arg Ala Pro Thr Lys Lys Arg Ile Lys Glu Leu Asp Arg Leu  
85 90 95  
Ala Val Arg Leu Glu Ala Leu Leu Lys Glu Ala Asn Gln Val Leu Asp  
100 105 110  
Ser Asp Ser Leu Lys Lys Ile Pro Ser Trp Ile Lys Gly Trp Glu Ser

115	120	125
Arg Trp Lys Gly Arg Thr Lys Gly Gly Glu Leu Ile Ser Glu Gly Glu 130 135 140		
Glu Glu Leu Tyr Asn Leu Ala Thr Arg Met Arg Glu Arg Phe Gln Asp 145 150 155 160		
Leu Phe Asp Asp Glu Tyr His Pro Asp Val Tyr Ser Ile Arg Ala Thr 165 170 175		
Gln Val Pro Arg Ala Ser Ala Ser Ala Val Ala Phe Gly Leu Gly Leu 180 185 190		
Leu Ser Gly Lys Gly Lys Leu Gly Gln Gly Lys Asn Arg Ala Phe Ser 195 200 205		
Val Leu Ser Glu Ser Arg Ala Ser Asp Ile Cys Leu Arg Phe Phe Asp 210 215 220		
Ser Cys Glu Thr Tyr Lys Ala Tyr Arg Arg Arg Lys Glu Pro Asp Val 225 230 235 240		
Glu Lys Gln Lys Glu Pro Ile Leu Glu His Val Thr Ala Ala Leu Val 245 250 255		
Asn Arg Tyr His Leu Lys Phe Thr Thr Arg Asp Val Ser Ser Leu Trp 260 265 270		
Phe Leu Cys Lys Gln Glu Ala Ser Leu Leu Asn Thr Thr Asn Gln Ala 275 280 285		
Cys Gly Leu Phe Asn Glu Ala Glu Val Arg Phe Leu Glu Trp Thr Asp 290 295 300		
Asp Leu Glu Gly Phe Val Leu Lys Gly Tyr Gly Glu Ser Ile Asn Tyr 305 310 315 320		
Arg Met Gly Leu Pro Leu Leu Lys Asp Val Val Gln Ser Met Glu Glu 325 330 335		
Ala Ile Ile Ala Arg Glu Glu Asn Arg Ala Asp Gly Thr Phe Glu Lys 340 345 350		
Ala Arg Leu Arg Phe Ala Leu Ala Glu Thr Val Val Pro Phe Ser Cys 355 360 365		
Leu Leu Gly Leu Phe Leu Glu Gly Pro Glu Ile Glu Arg Ile Gln Arg 370 375 380		
Glu Glu Ala Leu Asp Leu Pro Pro Leu Pro Pro Gln Gly Arg Asn Trp 385 390 395 400		
Lys Gly Ser Val Val Ala Pro Phe Ala Gly Asn Asn Met Leu Val Leu 405 410 415		
Tyr Gln Cys Pro Ser Lys Ile Ser Asp Gly Ser Thr Ile Ser Gly Gly 420 425 430		
Arg Asn Asn Ser Tyr Leu Val Gln Val Leu His Asn Glu Val Pro Val 435 440 445		

Ser Met Pro Gly Cys Gly Asn Lys Asp Phe Cys Pro Phe Glu Glu Phe  
450 455 460

Lys Glu Lys Ile Val Lys Pro His Leu Lys His Asp Tyr Asn Met Ile  
465 470 475 480

Cys Lys Val Lys Ser Pro Ala Ala Ser Glu Glu Pro Ala Ser Phe Ala  
485 490 495

Ser Arg Val Ser Ser Phe Phe Leu Gly Leu Leu Ser Gln Lys Gly Tyr  
500 505 510

Arg Gly Val Gly Ala Glu Gly Val Lys Thr Glu Leu  
515 520

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/02116

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/55 C12N15/29 C12N15/82 C12N9/16 A01H5/00  
A01H5/10 A23K1/165 A23L1/105

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 05785 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ; MAUGENEST SEBASTIEN (FR); PEREZ PASCUAL) 12 February 1998 (1998-02-12) cited in the application	1,5, 9-11, 13-26
Y	the whole document	9-12
Y	WO 99 37786 A (DONG JIN ZHUO ; GEORGES FAWZY (CA); DATLA RAJU S S (CA); CANADA NAT) 29 July 1999 (1999-07-29) abstract; claim 5 page 55, line 2 - line 5 page 90, line 22 - line 24	9-12
Y	WO 99 64579 A (DU PONT ; SHEN JENNIE BIH JIEN (US)) 16 December 1999 (1999-12-16) abstract; claims 1,9-13 page 8, line 4 - line 6	9-12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 October 2001

Date of mailing of the international search report

02/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ceder, 0

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02116

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 93 06712 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 15 April 1993 (1993-04-15) abstract; claim 6 page 11, line 13 - line 19 ---	9-12
X	WALBOT V.: "Maize ESTs from various cDNA libraries sequenced at Stanford University" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 May 1999 (1999-05-04), XP002162081 HEIDELBERG DE Ac AI649654 the whole document ---	3
X	SASAKI T.: "Oryza sativa cDNA, partial sequence (C12119_22Z)" EMBL SEQUENCE DATABASE, 7 June 1999 (1999-06-07), XP002162082 HEIDELBERG DE Ac AU068139 the whole document ---	3
X	GIBSON D M ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE FROM COTYLEDONS OF GERMINATING SOYBEAN SEEDS" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS,US,NEW YORK, US, vol. 260, no. 2, 1 February 1988 (1988-02-01), pages 503-513, XP000609747 ISSN: 0003-9861 abstract ---	5
A	WO 98 20139 A (FINNFEEDS INT LTD ;MORGAN ANDREW J (GB); SLEIJSTER SELIS HETTY E () 14 May 1998 (1998-05-14) abstract; claims page 3, line 9 -page 6, line 26 ---	1-26
A	WO 99 20746 A (LEFEBVRE DANIEL D ;GELLATLY KEVIN S (CA); PERFORMANCE PLANTS INC () 29 April 1999 (1999-04-29) page 4, line 20 -page 7, line 5 page 21, line 27 -page 22, line 14 ---	1-26
A	VERWOERD T C ET AL: "PHYTASE-ENRICHED TRANSGENIC SEEDS AS A NOVEL FEED ADDITIVE" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT,BE,GENT, vol. 58, no. 4A, 1993, pages 1719-1721, XP000618194 ISSN: 0368-9697 the whole document --- -/--	20-26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 01/02116

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MAUGENEST S ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ECODING A MAIZE SEEDLING PHYTASE" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 322, no. PART 02, 1 March 1997 (1997-03-01), pages 511-517, XP000673229 ISSN: 0264-6021 abstract; figure 1 -----	1,5
P,X	WO 01 04147 A (DU PONT ;CAHOON REBECCA E (US)) 18 January 2001 (2001-01-18) the whole document -----	1-26

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02116

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9805785	A	12-02-1998	FR 2751987 A1 AU 3944697 A CA 2261913 A1 EP 0938568 A1 WO 9805785 A1	06-02-1998 25-02-1998 12-02-1998 01-09-1999 12-02-1998
WO 9937786	A	29-07-1999	AU 2146199 A BR 9907223 A WO 9937786 A2 CN 1292822 T EP 1049785 A2 HU 0100315 A2 PL 342736 A1	09-08-1999 24-10-2000 29-07-1999 25-04-2001 08-11-2000 28-06-2001 02-07-2001
WO 9964579	A	16-12-1999	AU 4553899 A BR 9911525 A CN 1305532 T EP 1086235 A2 WO 9964579 A2	30-12-1999 09-10-2001 25-07-2001 28-03-2001 16-12-1999
WO 9306712	A	15-04-1993	AU 667848 B2 AU 2881292 A BG 61791 B1 BG 98695 A BR 9206613 A CA 2120629 A1 CN 1072722 A , B CN 1174236 A CZ 9400817 A3 EP 0666918 A1 HU 69781 A2 IL 103407 A JP 7503605 T MX 9205820 A1 NZ 244685 A RO 113256 B1 WO 9306712 A1 US 5552306 A US 5614393 A US 5689050 A US 5663068 A US 5789220 A ZA 9207777 A	18-04-1996 03-05-1993 30-06-1998 31-05-1995 11-04-1995 15-04-1993 02-06-1993 25-02-1998 13-09-1995 16-08-1995 28-09-1995 22-09-1999 20-04-1995 01-04-1993 27-06-1994 29-05-1998 15-04-1993 03-09-1996 25-03-1997 18-11-1997 02-09-1997 04-08-1998 21-04-1993
WO 9820139	A	14-05-1998	GB 2319030 A AU 7002198 A BR 9712731 A WO 9820139 A2 EP 0942993 A2 PL 333097 A1	13-05-1998 29-05-1998 26-10-1999 14-05-1998 22-09-1999 08-11-1999
WO 9920746	A	29-04-1999	US 5977435 A AU 9526898 A WO 9920746 A2 EP 1025215 A2 ZA 9809543 A	02-11-1999 10-05-1999 29-04-1999 09-08-2000 27-05-1999
WO 0104147	A	18-01-2001	AU 6082600 A	30-01-2001



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02116

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0104147	A	WO 0104147 A2	18-01-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/02116

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 7    C12N15/55    C12N15/29    C12N15/82    C12N9/16    A01H5/00 A01H5/10    A23K1/165    A23L1/105		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7    C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 98 05785 A (AGRONOMIQUE INST NAT RECH ;MAUGENEST SEBASTIEN (FR); PEREZ PASCUAL) 12 février 1998 (1998-02-12) cité dans la demande le document en entier -----	1,5, 9-11, 13-26
Y	WO 99 37786 A (DONG JIN ZHUO ;GEORGES FAWZY (CA); DATLA RAJU S S (CA); CANADA NAT) 29 juillet 1999 (1999-07-29) abrégé; revendication 5 page 55, ligne 2 - ligne 5 page 90, ligne 22 - ligne 24 -----	9-12  9-12
Y	WO 99 64579 A (DU PONT ;SHEN JENNIE BIH JIEN (US)) 16 décembre 1999 (1999-12-16) abrégé; revendications 1,9-13 page 8, ligne 4 - ligne 6 -----	9-12
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <span><input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents</span> <span><input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe</span> </div>		
° Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">23 octobre 2001</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">02/11/2001</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Ceder, 0</div>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 01/02116

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 93 06712 A (RHONE POULENC AGROCHIMIE) 15 avril 1993 (1993-04-15) abrégé; revendication 6 page 11, ligne 13 - ligne 19 ----	9-12
X	WALBOT V.: "Maize ESTs from various cDNA libraries sequenced at Stanford University" EMBL SEQUENCE DATABASE, 4 mai 1999 (1999-05-04), XP002162081 HEIDELBERG DE Ac AI649654 le document en entier ----	3
X	SASAKI T.: "Oryza sativa cDNA, partial sequence (C12119_22Z)" EMBL SEQUENCE DATABASE, 7 juin 1999 (1999-06-07), XP002162082 HEIDELBERG DE Ac AU068139 le document en entier ----	3
X	GIBSON D M ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHYTASE FROM COTYLEDONS OF GERMINATING SOYBEAN SEEDS" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS,US,NEW YORK, US, vol. 260, no. 2, 1 février 1988 (1988-02-01), pages 503-513, XP000609747 ISSN: 0003-9861 abrégé ----	5
A	WO 98 20139 A (FINNFEEDS INT LTD ;MORGAN ANDREW J (GB); SLEIJSTER SELIS HETTY E () 14 mai 1998 (1998-05-14) abrégé; revendications page 3, ligne 9 -page 6, ligne 26 ----	1-26
A	WO 99 20746 A (LEFEBVRE DANIEL D ;GELLATLY KEVIN S (CA); PERFORMANCE PLANTS INC () 29 avril 1999 (1999-04-29) page 4, ligne 20 -page 7, ligne 5 page 21, ligne 27 -page 22, ligne 14 ----	1-26
A	VERWOERD T C ET AL: "PHYTASE-ENRICHED TRANSGENIC SEEDS AS A NOVEL FEED ADDITIVE" MEDEDELINGEN VAN DE FACULTEIT LANDBOUWETENSCHAPPEN UNIVERSITEIT GENT,BE,GENT, vol. 58, no. 4A, 1993, pages 1719-1721, XP000618194 ISSN: 0368-9697 le document en entier ----- -/--	20-26

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 01/02116

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>MAUGENEST S ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF A CDNA ECODING A MAIZE SEEDLING PHYTASE" BIOCHEMICAL JOURNAL, GB, PORTLAND PRESS, LONDON, vol. 322, no. PART 02, 1 mars 1997 (1997-03-01), pages 511-517, XP000673229 ISSN: 0264-6021 abrégé; figure 1</p>	1,5
P, X	<p>WO 01 04147 A (DU PONT ;CAHOON REBECCA E (US)) 18 janvier 2001 (2001-01-18) le document en entier</p>	1-26

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/02116

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9805785	A	12-02-1998	FR 2751987 A1	06-02-1998
			AU 3944697 A	25-02-1998
			CA 2261913 A1	12-02-1998
			EP 0938568 A1	01-09-1999
			WO 9805785 A1	12-02-1998
WO 9937786	A	29-07-1999	AU 2146199 A	09-08-1999
			BR 9907223 A	24-10-2000
			WO 9937786 A2	29-07-1999
			CN 1292822 T	25-04-2001
			EP 1049785 A2	08-11-2000
			HU 0100315 A2	28-06-2001
			PL 342736 A1	02-07-2001
WO 9964579	A	16-12-1999	AU 4553899 A	30-12-1999
			BR 9911525 A	09-10-2001
			CN 1305532 T	25-07-2001
			EP 1086235 A2	28-03-2001
			WO 9964579 A2	16-12-1999
WO 9306712	A	15-04-1993	AU 667848 B2	18-04-1996
			AU 2881292 A	03-05-1993
			BG 61791 B1	30-06-1998
			BG 98695 A	31-05-1995
			BR 9206613 A	11-04-1995
			CA 2120629 A1	15-04-1993
			CN 1072722 A , B	02-06-1993
			CN 1174236 A	25-02-1998
			CZ 9400817 A3	13-09-1995
			EP 0666918 A1	16-08-1995
			HU 69781 A2	28-09-1995
			IL 103407 A	22-09-1999
			JP 7503605 T	20-04-1995
			MX 9205820 A1	01-04-1993
			NZ 244685 A	27-06-1994
			RO 113256 B1	29-05-1998
			WO 9306712 A1	15-04-1993
			US 5552306 A	03-09-1996
			US 5614393 A	25-03-1997
			US 5689050 A	18-11-1997
			US 5663068 A	02-09-1997
			US 5789220 A	04-08-1998
			ZA 9207777 A	21-04-1993
WO 9820139	A	14-05-1998	GB 2319030 A	13-05-1998
			AU 7002198 A	29-05-1998
			BR 9712731 A	26-10-1999
			WO 9820139 A2	14-05-1998
			EP 0942993 A2	22-09-1999
			PL 333097 A1	08-11-1999
WO 9920746	A	29-04-1999	US 5977435 A	02-11-1999
			AU 9526898 A	10-05-1999
			WO 9920746 A2	29-04-1999
			EP 1025215 A2	09-08-2000
			ZA 9809543 A	27-05-1999
WO 0104147	A	18-01-2001	AU 6082600 A	30-01-2001

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 01/02116

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0104147 A		WO 0104147 A2	18-01-2001